

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut des Sciences du Végétal
Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 12/03/2015

par

Viviane MARY

Caractérisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana*
affectés dans le stockage du fer dans leurs graines

Composition du jury :

Directeur de thèse : Sébastien THOMINE
Rapporteurs : Stéphane MARI
Thierry DESNOS
Examineurs : Helen NORTH
Jacqui SHYKOFF

Directeur de recherche (CNRS, Gif-sur-Yvette)
Chercheur (INRA, Montpellier)
Chercheur (CEA Cadarache, Saint Paul Lez Durance)
Directrice de recherche (INRA, Versailles)
Directrice de recherche (CNRS, Université Paris Sud, Orsay)

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut des Sciences du Végétal
Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 12/03/2015

par

Viviane MARY

Caractérisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana*
affectés dans le stockage du fer dans leurs graines

Composition du jury :

Directeur de thèse : Sébastien THOMINE
Rapporteurs : Stéphane MARI
Thierry DESNOS
Examineurs : Helen NORTH
Jacqui SHYKOFF

Directeur de recherche (CNRS, Gif-sur-Yvette)
Chercheur (INRA, Montpellier)
Chercheur (CEA Cadarache, Saint Paul Lez Durance)
Directrice de recherche (INRA, Versailles)
Directrice de recherche (CNRS, Université Paris Sud, Orsay)

Remerciements

Ayé, le grand moment des remerciements est arrivé... Cela fait 4 ans, 2 mois et 2 jours que je suis dans ce laboratoire et me voilà à soutenir ma thèse....

Je n'aurais pas les mots suffisants pour remercier **Sébastien**, mon directeur de thèse et dirigeant de l'équipe. Si c'est un plaisir de travailler dans l'équipe, c'est en grande partie grâce à toi. Merci de m'avoir confié le sujet de stage de Master 2, la poursuite du crible, de m'avoir entraînée pour le concours de l'ED, d'avoir encadré les plus que 3 ans de thèse et géré mon tempérament pas assuré. J'ai appris énormément scientifiquement et humainement parlant. Merci de m'avoir permis de m'investir en dehors et en plus du laboratoire dans ma mission de vulgarisation au Palais de la Découverte, dans le Conseil de l'ED (jusqu'à être doctorante observatrice lors du concours 2013) puis dans le Conseil du Laboratoire, au sein de l'association des doctorants. Merci de m'avoir réintégrée à l'équipe après mon arrêt maladie : il s'en est passé des aventures en 4 ans... Merci de m'avoir permise d'accéder à des congrès internationaux : le Cost Action de Venise, l'ISINIP de Amherst et de Gatersleben, l'EPSR de Norwich. Je te souhaite encore de belles années dans le nouvel institut et avec une équipe plus que dynamique.

Je tiens à remercier les membres de mon jury ayant accepté la responsabilité de rapporteurs, **Stéphane MARI** et **Thierry DESNOS**, d'examinatrice, **Helen NORTH**, et de présidente **Jacqui SHYKOFF**. Merci de l'intérêt que vous porterez à mon travail et à nos prochaines discussions.

Un second merci à **Jacqui** et son École Doctorale Sciences du Végétal (ED145 de l'Université Paris Sud). Je pense que peu de directeurs d'ED accueillent autour d'un barbecue chez eux leurs étudiants pour discuter de leurs futurs et du fonctionnement de l'ED. Que cette entente productive et efficace entre équipe directrice et doctorants reste ainsi le plus longtemps possible. Merci également à sa directrice adjointe et conseillère aux thèses **Marianne DELARUE**, ainsi qu'à notre secrétaire d'ED **Martine FOURNIER** pour sa réactivité et chaleur humaine

Une thèse c'est aussi un labo et le labo est pour beaucoup dans la thèse. Ce fut un grand honneur de faire partie du « **groupe ST** ». Je ne me lancerai pas à énumérer la liste des bons moments qu'il est possible de vivre à vos côtés : entre les réunions hebdomadaires et les sorties à Disneyland Paris (oui, on travaille beaucoup).

Pour tenter de n'oublier personne entre ceux qui sont permanents et ceux qui passent, je vais reprendre dans l'ordre : les « métalleux » avec **Magali** (ma co-encadrante de Master 2, merci pour m'avoir appris la rigueur, de m'avoir laissé l'accès aux expériences de μ PIXE et à SOLEIL, et de toujours me suivre dans cette aventure avec tes relectures et commentaires d'articles), **Astrid** (sans ma chère Astrid je serais toujours aussi inhibée avec l'anglais, la piscine et plein d'autres choses, merci d'avoir pris le temps de me répéter et re-répéter les bases de génétique), **Jérôme** (merci pour tes « Tranquille... » que je me repasse parfois), **Sylvain** (merci pour les premiers entraînements de courses à pied, pour la formation en génétique et le savoir-faire de belles images pour les présentations), **Mathieu P.** (merci d'avoir « partagé » ton directeur de

thèse avec une stagiaire de M2 puis avec une autre thésarde, d'avoir été un « colocataire » de paillasse et pour tous les autres bons moments au laboratoire), **Van Anh** (thanks to you for your presence and friendship, good luck for your going back to Vietnam and enjoy your reunion with your daughter, it was a pleasure to help you with the french administration), **Cindy** (des fous rires, une formation impeccable aux extractions de protéines de levures et western blot, encore merci pour ta bonne humeur), **Thien-Dû** (merci d'avoir essuyé les pots cassés, d'avoir été mon premier stagiaire à part entière, je t'en ai fait faire beaucoup en quelques semaines et je n'étais pas d'un calme olympien à l'époque), **Colin** (merci d'avoir continué et quasi-terminé la classification aux Perls/DAB des supprimeurs et d'avoir passé presque toutes les M3. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite), **Sofia** (merci pour ton aide et ta gentillesse, tu as aussi supporté mes remarques et corrections assez pinailleuses sur tes rapports et présentation de stage, bonne continuation à toi), **Florian** (fraîchement débarqué au laboratoire, je ne peux que t'y souhaiter ton épanouissement et ta réussite du concours auprès de Sylvain), **Jacob**, **Eiri** (thanks for everything, scientific discussions or about life, you were there when the sequencing result fall and I keep your « never give up » picture on my desk until the end and beyond...), **Viviane L.** (quelle coïncidence d'être deux Viviane dans le même laboratoire et jusqu'à trois dans le même institut pour moi qui n'en avait pas croisé une seule), **Fanfan** (notre « maman de labo », un vrai rayon de soleil et de bonnes humeurs, ce fut un plaisir d'être à tes côtés).

Merci aux occupants du 125, avec une dédicace spéciale à **Sophie** et **Alexis** pour m'avoir intégrée à leur bureau le temps de la rédaction. Merci **Sophie** de ton soutien amical et d'avoir supporté mes battements de pieds frénétiques tentant de suivre la musique dans mes écouteurs. Merci **Alexis** d'avoir tenté de me stresser au-delà de mon initiative personnelle. Merci **Chi Tam** de ton calme et de ta présence à mes débuts au laboratoire, je n'avais pu être là pour ta soutenance mais je te sais sur une belle lancée. **Petit Sylvain**, **Edgar** et **Aïna**, vous avez été des stagiaires CLC plus que sympathiques et vos conversations jusqu'à pas d'heure manquent au labo. **Mathieu J.**, ton couronnement au poste de maître de conférences a été rapide après mon arrivée au labo mais ta sérénité olympienne reste un exemple. Merci **Thierry** pour les rires, les parties de foot en plein cagnard sur le stade de Gif (sans entorse, la prochaine fois) et d'avoir, comme les autres stagiaires et parfois permanents, supporté mes pinailleries sur les présentations, bon vent dans la sélection du colza. **Elsa**, on ne se sera pas croisées longtemps mais je te souhaite une belle thèse, plein de réussite et de résultats et *vice versa*. **Nicolas**, je te souhaite une belle continuation.

Passons aux mécano-sensibles ou propriétaires du 123... Merci **Jean-Marie** pour les discussions politico-scientifico-religieuso insolubles de l'amibe amidonnée et autres pirouettes humoristiques dignes de Bobby Lapointe. **Tiffanie**, merci d'avoir été un pilier dans mes débuts au laboratoire, merci pour le perçage d'oreilles et l'initiation à la fréquentation du salon de tatouages de Versailles. Je te souhaite un bel avenir à la hauteur de tes espérances. **Rafael**, tu as été un des stagiaires puis l'unique apprenti qui soit resté aussi longtemps de mon temps au labo. Je t'espère heureux dans ton nouveau labo et te souhaite plein de bonnes choses. **Daniel**, merci pour les pauses clopes (de mon temps de fumeuse), les discussions et entraînements sportifs aux bords de la torture concernant tes pompes bizarroïdes, bonne continuation et attention aux vagues (en kayak bien entendu). 🎵 Merci **Marjo**, merci Marjo, quel plaisir d'avoir bossé avec toi 🎵 (à chanter sur l'air de "Merci patron" des Charlots) ; entre les fous rires, les entraînements à la Frappadingue et la course en elle-même, ta capacité à virer au rouge pivoine à certaines

allusions... je ne vais pas oublier tout cela de si tôt. **Lydia, Gwena, François** et **Mamitiana**, bravo pour vos stages (dont l'un, toujours d'actualité) et de belles suites à vous. Je n'oublie pas les dames du 129 : **Marie-Jo, Marie** et **Christiane** que j'ai le plaisir de croiser à l'occasion de nos traditionnels « repas de Noël » du labo.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse : **Annie MARION-POLL, Jean-François BRIAT** et **Jean-Denis FAURE** qui ont supporté mes innombrables noms « terminatoriens » de mutants et de croisements accompagnés des graphiques de ségrégations. Je n'ai pas réussi à tout faire, à suivre toutes les bonnes idées mais certaines sont amorcées et prêtes pour le prochain qui s'attellera au projet.

J'ai eu la joie de réaliser une mission de vulgarisation scientifique durant 3 ans dans un « haut lieu de science parisien » : le Palais de la Découverte. Merci à toute l'équipe du département des Sciences du Vivant et au labo : **Marie-Thérèse CANARD, Gaëlle, Marie-Agnès, Stéphanie, Élodie T., Élodie D., Tanguy, Aurélie, Jean-Philippe, Yann, Philippe, Christophe, Adrien, Pauline**, mais aussi des autres départements : **Emmanuelle, Magali, Emmanuel, Frédérique, Véronique, Ludo, Romain, Robin** ou encore ceux qui étaient de passage : **Noémie, Claire, Vincent, Quitterie...** et j'en oublie. Bon je n'ai pas donné de noms ni aux Néphiles ni aux Grenouilles rieuses... Les anecdotes d'exposés me sont nombreuses et je tenterais de revenir vous voir en visiteuse d'ici peu.

Que serait une thèse sans les copains de promo (la période tendue du concours passée) et de galères (thésards et non-thésards dans le même panier). Merci d'avoir été mes bouffées d'air !!! Merci de m'avoir rappelé qu'il n'y a pas que la thèse dans la vie, il y a l'Asso aussi... avec : **Chloé, Stéphane, Lucille, Yasmine, Michaël, Céline, Marie-Capucine, Linda, Aurélien, Adrien, Manon, Cécile, Kathleen, Marjorie** (bis), **Kader**, ... Y'a les irréductibles de l'ISV toujours là pour un repas des non-permanents, une bière dans l'un des deux bars de Gif (choix restreint me direz-vous mais pour se retrouver c'est pratique) ou lors d'une sortie parisienne, sans oublier le taxi Gif-Massy RER pas trop regardant sur l'heure de départ. Merci donc à **Anne** (je n'ai pas les bons mots pour décrire comment la vie au labo serait pire que différente si tu n'avais pas été là), **Arthur** (oui, bon, j'avoue, y'a des choux, comme d'habitude, bonne suite de thèse et tout ira bien dans le meilleur de ton monde), **Marjorie** (ter), **Guillaume** (avec un merci supplémentaire pour avoir pris ma place au Conseil de Labo et à celui de l'ED), **Sara M.** (pour ton franc parler, ta subtile manière de mettre les gens à l'aise et ton efficacité à désinhiber n'importe qui à parler anglais voire tenter le portugais), **Théophile** (merci mon binôme de Conseil de Labo, continue à t'accrocher et je te souhaite une belle fin de thèse et du mieux encore pour après), **Yannick** (mon binôme de Master 2, à qui c'est bientôt le tour de soutenir, courage pour la dernière ligne droite), **Mathieu P.** (bis), **Van Anh** (bis), les occupants des hautes sphères du 23 (**Laurie, Sébastien P., Mélanie, Julien, Anthony, Sara P., Roberta, Enric, Greg**).

Mais y'en a d'autres que j'aimerais remercier : **Séverine** (les années sont passées trop vite après le master, mais ce fut un plaisir d'avoir été une amie et binôme), **Cyntia** (olà, que dire, les discussions autour du « panier repas » afin de se raconter les dernières poisses, toi en biochimie, moi en génétique, bientôt ton tour -*rire machiavélique*- non, je plaisante-, plein d'ondes positives de ma part), **Anaïs C.** (et ben, je ne pensais pas coacher quelqu'un un jour de cette manière mais vu que cela a fonctionné... bon j'ai poussé le vice jusqu'à avoir toujours tes montants d'étagères en

pension, belle thèse à Lyon, on se retrouve pour les prochaines épisodes), **Katia B.** (au plaisir de recroiser ma spécialiste en immunolocalisation sur embryon d'Arabido au vidéoclub du coin), **Catherine B., Marc B., Camille C., Erwan D., Thomas D., Élian G., Benoit G.** (merci pour les passages au labo et discussions afin de se remonter le moral et peut-être à bientôt dans la salle des profs d'un lycée de biotech, qui sais...), **Anso B.** (merci de m'avoir rappelé que « non, on ne vis pas dans un monde de Bisounours et pourtant on re-signe avec un post-doc »), **Ronan M. et Élise V.** (merci car mon temps rennais est un peu loin et peu sont restés en contact, au passage, bravo pour vos titres de docteurs), **Vanessa U., Laure D., Younes, Julie S., Samy C., Louis G., Aude M., Jean-Claude P.** et j'en ai sûrement oublié... Mille excuses.

Je n'aurais pas atterri là aujourd'hui sans la participation des gens des laboratoires que j'ai traversés et des encadrants qui m'ont portée et supportée : **Laurent LEPORT, Alain BOUCHEREAU, Xavier PERCHE, Nicolas JUIGNET** (merci pour cette sacré première expérience et pour la vraie carte blanche), **Yves DEVEAUX, Martin KREIS, Séverine DOMENICHINI** (merci pour m'avoir laissé accéder à un labo de la « banane verte » et avoir permis mes débuts avec Arabidopsis), **Jean-Christophe PALAUQUI** et **Jean-Denis FAURE** (pour m'avoir permis de toucher à la microscopie sous de nombreuses formes et contribuer à la recherche sur OCTOPUS).

La thèse, c'est un labo mais au sein d'un institut qui tourne. Merci à l'administration de l'ISV et à sa directrice **Hélène BARBIER-BRYGOO**, merci pour votre accueil et votre présence/patience. Merci aux services communs grâce auxquels il est plus simple de travailler : **Christine, Lammia, Patrick, Philippe, Guillaume, Célestin, Karine, François, Artur et Pascale.** Merci à **Olivier** de nous avoir permis d'organiser nos apéros non-permanents en espérant que la tradition s'instaure dans le nouvel institut.

Merci au Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche pour le financement de ma thèse, je remercie au passage le jury qui m'a évaluée ce 27 juin 2011.

Je ne serais pas grand-chose sans ma famille et le soutien de mes amis les plus proches. Merci aux Kremlinois de frangins, aux parisiens de tante, oncle et cousins, à ma Chantelouvaie de tante, à mes Cormeillaise et Bordelaise de cousines, à mes Normands de cousins...

Merci les amis d'être là et d'exister : **Milly et Xavier, Caro, Margot, Claudie et Louis, Delphine et Grégoire,** les **Tessier,** Monsieur **Bertrand WEIL, Anne, Laura** (l'unique coloc), **Jean-Denis, Typhaine et Antoine, Hajer, Aline.**

Un merci un peu particulier pour le coach et paternel, **Daniel.** Le manuscrit aurait plus de non-accords du participe passé que de lignes sans toi. Et Sébastien aurait pu de nouveau dire « *tes Me font vos yeux beaux mourir, belle Marquise, d'amour.* ça suffit » (en parlant de mon écriture alambiquée). Merci Papa !

Je ne sais pas si cela se fait mais...

... À Mam'Odile

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
Les propriétés redox du fer sont essentielles pour le métabolisme cellulaire	1
Toxicité du fer	1
La disponibilité du fer dans le milieu est souvent limitante	2
Mécanismes de transfert du fer dans la plante : du sol à la graine	3
Absorption	3
Les ligands du fer dans la plante	5
Transport longue distance : des racines aux parties aériennes	6
Distribution dans les tissus	7
Distribution intracellulaire	8
Mobilisation des organes sources vers les organes puits	9
Entrée dans la graine	10
Stockage au sein de la graine	12
Utilisation du fer lors de la germination	13
Utilisation des connaissances sur l'homéostasie du fer pour la biofortification	14
Objectifs de la thèse	16
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	18
1. Matériel	18
1.1. Souches de levures	18
1.1.a. Génotypes	18
1.1.b. Milieux et conditions de cultures	18
1.2. Matériel végétal	18
1.2.a. Génotypes étudiés	18
1.2.b. Culture <i>in vitro</i>	19
1.2.c. Production de plantes entières, siliques, graines en espace S2	19
2. Méthodes	20
2.1. Coloration histologique du fer au Perls/DAB	20
2.2. Analyse des contenus en métaux	20
2.3. Techniques de biologie moléculaire	20
2.3.1. Extraction d'ADN génomique	20
2.3.1.a. Extraction rapide d'ADN génomique	20
2.3.1.b. Extraction d'ADN par kit Qiagen® « DNAeasy Plant Minikit »	21
2.3.1.c. Extraction d'ADN pour séquençage haut-débit	20
2.3.2. Génotypage	22
2.3.2.a. PCR de génotypage des allèles mutants par insertion d'ADN-T dans <i>NRAMP3</i> et <i>NRAMP4</i>	22
2.3.2.b. Amplification, purification sur gel et séquençage du gène VIT1	22
2.3.3. Extraction d'ARN totaux de siliques	23
2.3.4. RT-PCR et vérification par séquençage des amplicons	23

2.3.5. Mutagenèse	23
2.3.6. Expression en levures	24
2.4. Techniques de biochimie	24
2.4.1. Extraction des pigments et analyses	24
2.4.2. Extraction de protéines de levures	24
2.4.3. Dosage des protéines par coloration « Amidoblack »	25
2.4.4. Séparation des protéines par électrophorèse et Western blot	25
2.5. Analyse des données de séquençage haut-débit de Eurofins©	26
2.5.1 Matériel	26
2.5.2 Méthodes	26
2.5.2.a. Alignement des séquences à une référence	26
2.5.2.b. Détection des SNP	27
2.5.2.c. Comparaison des SNP entre 3 séquences	27
2.6. Organisation du crible des supresseurs de <i>nramp3nramp4</i>	27
 Chapitre 1 : LE CRIBLE.....	 29
Principe du crible	29
Résultats du crible primaire	29
Confirmation du phénotype supresseur et rétrocroisements	29
Méthodes de classification sur des données physiologiques	30
Identification d'une mutation dominante par séquençage haut débit	31
Importance du génotypage à chaque étape de la sélection	33
 Chapitre 2 : ARTICLE SOUMIS	 35
Identification du locus supresseur <i>via</i> la distribution du fer dans les embryons	35
Abstract	39
Introduction	40
Material and Methods	41
Results	45
<i>Identification of mutants with restored growth on low Fe in a mutagenized population of nramp3nramp4 seedlings</i>	
<i>Identification of two new vit1 mutant alleles on the basis of their Fe distribution pattern</i>	
<i>The triple knockout mutant nr3nr4vit1-1 recapitulated the phenotype of isv1 and isv2 on low Fe medium.</i>	
<i>The mutations in AtVIT1 gene sequence are responsible of the suppressor phenotype in isv1 and isv2 mutants.</i>	
<i>The vit1-3 mutation prevents the production of functional AtVIT1 mRNA in isv2.</i>	
<i>The G77D mutation impairs the ability of AtVIT1 to transport Fe in yeast.</i>	
<i>Sub-epidermal iron stores are efficiently remobilized during germination in the absence of AtNRAMP3 and AtNRAMP4.</i>	
<i>Subcellular localization of iron in cotyledon subepidermal cells</i>	
Discussion	55
<i>Novel mutations provide insights into AtVIT1 protein structure-function relationships</i>	
<i>VIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4 define a functional module for iron storage in endodermal cells.</i>	

<i>A range of phenotypes associated with the localization of Fe stores in embryos and their mobilization</i>	
<i>Is storage in vacuolar globoids bypassed in nramp3nramp4vit1-1 cotyledons ?</i>	
Conclusion	58
Aknowledgements	58
Litterature	59
CONCLUSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES.....	67
1. Conclusion, apports du travail de thèse	67
2. Perspectives sur la caractérisation de VIT1	68
2.1. Fonction de la protéine VIT1	68
2.2. Régulation de <i>VIT1</i>	69
2.3. Signification fonctionnelle du patron de répartition dans l’embryon	69
3. Perspectives ouvertes par les autres candidats	71
4. Faut-il poursuivre le crible ?	72
5. Suppression des autres phénotypes du mutant <i>nramp3nramp4</i>	73
6. Conclusion	73
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74
ANNEXES.....	86
ANNEXE 1 : Liste de 32 candidats confirmés en crible secondaire	86
ANNEXE 2 : Liste des candidats confirmés dont on dispose de F1	86
ANNEXE 3 : Classification au Perls/DAB des candidats	87
ANNEXE 4 : Article “Using μ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in <i>Arabidopsis thaliana</i> seeds”	88

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Exemples de coordination du fer dans ces protéines.

Figure 2 : Carte mondiale des sols et leurs différents pH.

Figure 3 : Chlorose internervaire induite par la carence en fer chez le citronnier.

Figure 4 : Carte du monde de l'anémie touchant les enfants âgés de 0 à 5 ans avec une échelle de couleur selon la sévérité du problème de santé publique.

Figure 5 : Schéma d'une cellule d'épiderme racinaire illustrant les étapes de la stratégie 1 d'acquisition du fer : avec les quatre étapes : sécrétion de composés phénoliques, acidification, réduction et absorption.

Figure 6 : Structure de différents ligands du fer.

Figure 7 : Le transporteur FRD3 est impliqué dans la distribution du fer entre les racines et les parties aériennes par chargement et déchargement du citrate dans et depuis le xylème

Figure 8 : Le transporteur OPT3 est impliqué dans la distribution du fer à l'embryon

Figure 9 : Les tissus vasculaires maternels sont interrompus à l'extrémité du funicule et ne sont pas connectés à l'embryon en développement.

Figure 10 : Alimentation en fer de l'embryon d'*Arabidopsis* au cours de son développement.

Figure 11 : Patron d'expression du gène *AtVIT1* mise en évidence par coloration GUS (A, B et D) et par imagerie de la fluorescence de «ImaGene Green™ C₁₂FDGlcU» (C).

Figure 12 : Répartition du fer dans les embryons du mutant *vit1-1* en comparaison avec le sauvage.

Figure 13 : Patrons d'expression des gènes *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* mis en évidence par coloration GUS.

Figure 14 : Mobilisation des réserves en fer dans l'embryon.

Figure 15 : Exemple de biofortification par transformation génétique.

Encart 1 : Protéines de la famille VIT1 : les VTL

Figure 16 : Arbre phylogénétique des protéines VTL et homologues d'*Arabidopsis* (*AtVIT1*, *AtVTL1*, *AtVTL2*, *AtVTL3*, *AtVTL4*, *AtVTL5*), de riz (*OsVIT1.1*, *OsVIT1.2*), de la tulipe (*TgVIT1*), du soja (*GmNODULIN21*), du lotier (*LjSEN1*), du bleuet (*CcVIT1*) et de la levure (*ScCCC1p*).

Encart 2 : Protéines de la famille NRAMP

Figure 17 : Arbre phylogénétique des protéines NRAMP et homologues d'*Arabidopsis*, de riz, de la tomate, de la levure, de *Staphylococcus capitis* et d'homme.

Figure 18 : Organigramme récapitulant les différentes étapes du crible et de la caractérisation des mutants.

Figure 19 : Crible de la génération M2.

Figure 20 : Confirmation à la génération M3.

Figure 21 : Répartition des patrons de distribution du fer observés lors de la classification des candidats issus du crible.

Figure 22 : Patron de distribution du fer observé lors de la classification des candidats issus du crible.

Figure 23 : Répartition des patrons de distribution du fer observés lors de la classification des candidats issus du crible.

Figure 24 : Alignement des paires de lecture séquencées de *nramp3nramp4* sur le génome de référence de Col0 dans la région du gène *NRAMP3*.

Figure 25 : Alignement des paires de lecture séquencées de *nramp3nramp4* sur le génome de référence de Col0 dans la région du gène *NRAMP4*.

Figure 26 : Schéma représentant le principe de la recherche de variants/SNP, de la cartographie de la zone où se trouve la mutation et identification d'une mutation dominante responsable du phénotype suppresseur.

ARTICLE

Figure 1: *isv1*, *isv2* and : *nr3nr4vit1-1* suppress chlorosis and developmental arrest phenotypes of *nr3nr4* on low iron medium after germination.

Figure 2: *isv1*, *isv2* , T-DNA mutants *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* display similar iron distribution patterns in embryos.

Figure 3: *isv1* and *isv2* carry mutations in the *VIT1* gene.

Figure 4: The suppressor phenotype of *isv1* and *isv2* candidates is due to the mutations in *VIT1*.

Figure 5: The impact of *vit1-2* and *vit1-3* mutations on *VIT1* mRNA structure.

Figure 6: The *VIT1* G77D transporter does not rescue the $\Delta ccc1$ yeast mutant.

Figure 7: Iron stores are efficiently remobilized during *vit1-1* and *nr3nr4vit1* mutant seedling development.

Figure 8: Working model of *VIT1* and *NRAMP3/NRAMP4* respectively during seed development/maturation and germination in *Arabidopsis thaliana* embryo

Supplemental table I: Metal concentrations in seeds measured by Atomic Absorption Spectrometry.

Supplemental figure 1: Protein alignment of *VIT1* homologues from yeast (ScCCC1c), *Arabidopsis* (AtVIT1), rice (OsVIT1.1 and OsVIT1.2), tulipa (TgVIT1), *Lotus japonicus* (LjSEN1) and soybean/*Glycine max* (GmNODULIN-21).

TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des amorces utilisées pour les différentes amplifications.

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions utilisées pour l'alignement de la séquence à la référence

Tableau 3 : Récapitulatif des conditions utilisées pour la détection des SNP entre la séquence et la référence

Tableau 4 : Résultats chiffrés du traitement des données de séquençage haut-débit.

Abbreviations

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNg	ADN génomique
ADNc	ADN complémentaire
AHA	Arabidopsis H ⁺ ATPase
ALMT	Aluminium-activated Malate Transporter
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
Ca	Calcium
CCC1	Cross-complements Ca ²⁺ phenotype of <i>CsgI</i>
Col0	Columbia 0
CTAB	Bromure d'héxadécyltriméthylammonium
CTR1	Copper Transporter 1
DAB	Diaminobenzidine
DMA	DeoxyMugineic Acid
DO	Densité Optique
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EMS	Méthanesulfonate d'éthyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F1, F2, F3	Backcross generation
F6'H1	Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase 1
Fe	Fer
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
FER2	Ferritin 2

Ferrozine	[3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine]
FIT	FER-like Iron deficiency Transcription factor
FPN	Ferroportin
<i>frd</i>	ferric reductase defective
FRD3	Ferric Reductase Defective 3
FRO2	Ferric Reductase Oxidase 2
FutC	ferric iron uptake
g	gramme
GDP	Glucose Di-Phosphate
h	heure
H ⁺	Proton
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBED	N,N'-di(2-hydroxybenzyl)ethylene diamine-N,N'- diacetic acid monochloride
hydrate	
HMA	Heavy Metal P-type ATPase
HO·	Radical hydroxyl
IREG1	Iron Regulated 1
IRT1	Iron Regulated Transporter 1
<i>isv</i>	bypass iron storage in vacuoles
K	Potassium
LC-ICP MS	Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma atomic emission spectroscopy/Mass Spectrometry
M0, 1, 2, 3	Mutagénèse generation
MA	Mugineic Acid
MATE	Multidrug And Toxin Extrusion
MAR1	Multiple Antibiotic Resistance
MES	Acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique
Mg	Magnésium
mg	milligramme
min	minute
mL	milliliter

mM	millimolaire
Mn	Manganèse
MTP	Metal Tolerance Protein
m/v	masse par volume
NA	Nicotianamine
NaAc	Acétate de sodium
NAAT	Nicotianamine AminoTransferase
NAP14	Non-intrinsic ABC Protein 14
NAS	Nicotianamine Synthase
<i>nr3nr4</i>	double mutant <i>nramp3nramp4</i>
NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
O ₂ ⁻	Anion superoxide
OPT	OligoPeptide Transporteur
PCBP	Poly (rC) Binding Protein
PDR9	Pleiotropic Drug Resistance 9
PIC1	Permease in the Inner envelope of the Chloroplast 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIXE	Particle-Induced X-ray Emission
q.s.p.	quantité suffisante pour
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotation par minute
RT	Reversed Transcription
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetic Define medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sXRF	synchrotron radiation induces X-Ray Fluorescence
TAE	Tris Acetate EDTA
T-DNA	Acide désoryribonucléique de transfert
TOM1	Transporter Of Mugineic acid
VIT1	Vacuolar Iron Transporter 1

VTC	Vitamin C
VTL	Vacuolar iron Transporter Like
WHO	World Health Organization
Ws	Wassilewskija
XAS	spectroscopie d'absorption des rayons X
YNB	Yeast Nitrogen Base
YS	Yellow Stripe
YSL	Yellow Stripe-Like
ZIP	ZRT (Zinc Regulated Transporter) IRT-like Protein
Zn	Zinc
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromolaire

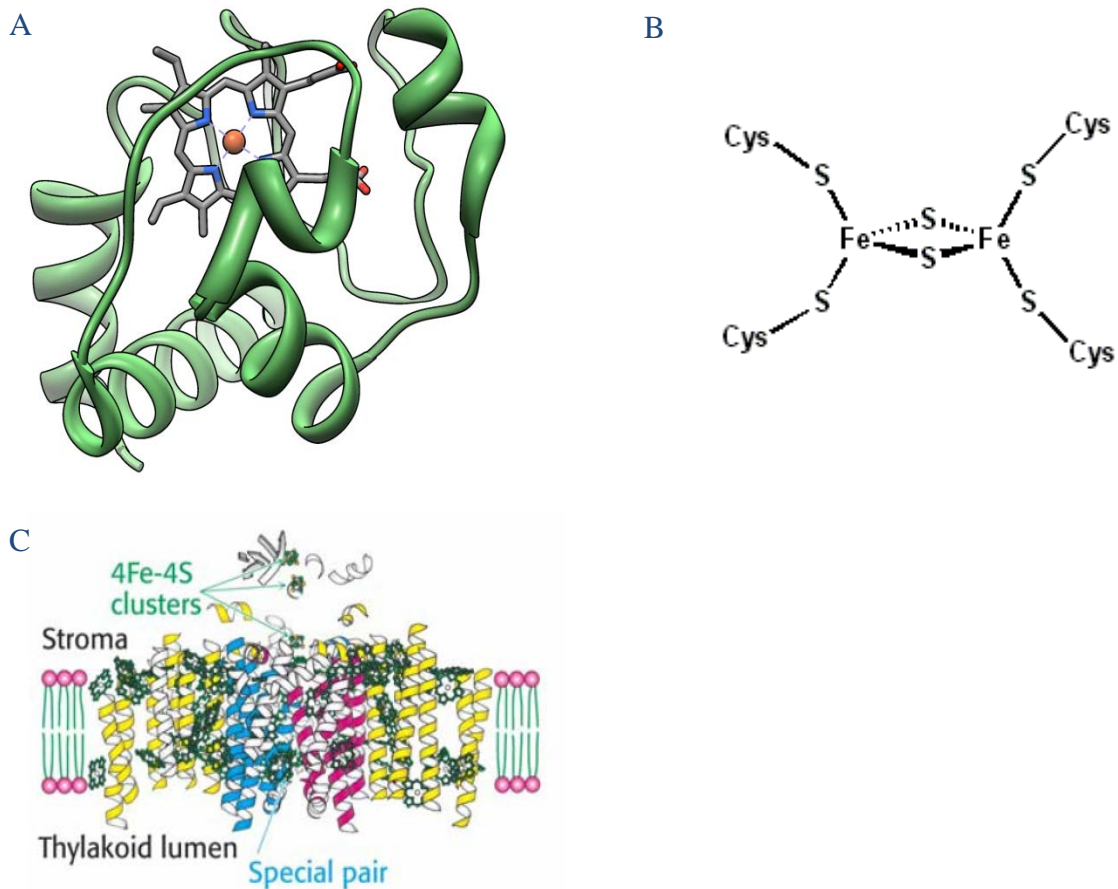


Figure 1 : Exemples de coordination du fer dans ces protéines.

A Structure du cytochrome c avec le fer (en orange) au sein d'un hème ou noyau tétrapyrrolique

B Coordination du centre Fe_2S_2 de la ferredoxine par 4 cystéines

C Structure du photosystème I. Les sous-unités psaA et psaB sont représentées en jaunes avec les régions homologues au cœur du photosystème II en rouge et bleu. Les molécules de chlorophylles et les 3 clusters 4Fe-4S sont en vert (Tirée de Berg *et al.*, 2002)

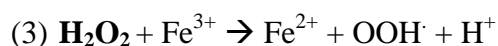
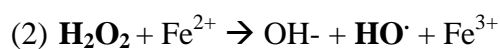
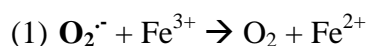
INTRODUCTION

Les propriétés redox du fer sont essentielles pour le métabolisme cellulaire

Le fer est un élément essentiel au développement de presque tous les organismes vivants dont les plantes. En effet, les tissus végétaux contiennent autour de 100 mg de Fe par kg de poids sec (Marschner, 1995). Le fer est le microélément dont les plantes ont le besoin le plus important. Par son existence sous deux formes (fer ferrique Fe^{3+} et fer ferreux Fe^{2+}), le fer participe à la catalyse des réactions d'oxydo-réductions. Ce métal est impliqué dans de nombreux processus métaboliques comme les chaînes de transfert d'électrons de la respiration et de la photosynthèse mais également comme composant de cofacteurs d'enzymes responsables de réactions d'oxydo-réductions. Par exemple, on trouve 12 atomes de fer sous forme de clusters fer-souffre associés aux protéines du photosystème I (Figure 1). On trouve le fer sous forme de noyaux hème dans les cytochromes et les peroxydases ou directement coordonné par les acides aminés de la protéine dans le cas des superoxydes dismutases. Tous ces systèmes exploitent la capacité du fer à passer de l'état fer ferrique à fer ferreux et réciproquement.

Toxicité du fer

Cette aptitude du fer a un « revers » : il peut participer à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) *via* les réactions de Fenton ou le cycle Haber-Weiss (Haber and Weiss, 1932, Halliwell, 1978). Ainsi, le fer ferrique libre réagit avec l'anion superoxyde O_2^- (forme réactive de l'oxygène, radicalaire et nocive) (1). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (forme active mais non radicalaire) réagit avec le fer ferreux libre pour produire le radical hydroxyl HO^\cdot et avec le fer ferrique pour produire d'autres formes radicalaires (2 et 3). Ces radicaux libres sont extrêmement réactifs et donc toxiques : ils sont capables d'oxyder les lipides, les protéines et les acides nucléiques, ils causent de ce fait d'importants dommages cellulaires.



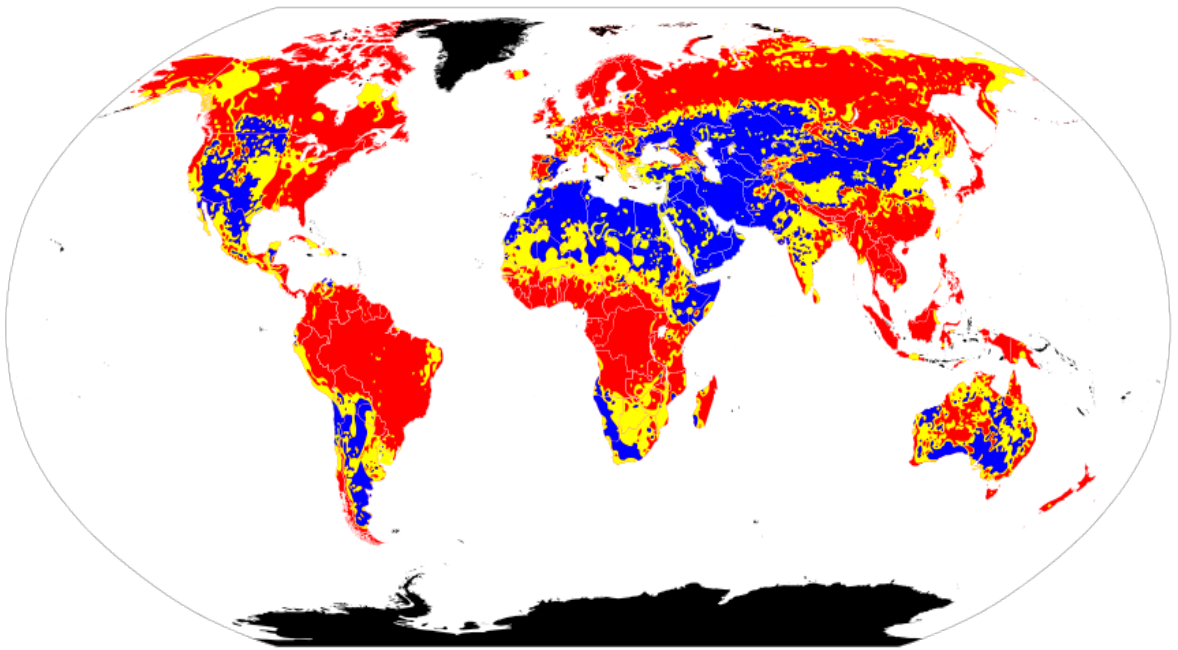


Figure 2 : Carte mondiale des sols et leurs différents pH.

En rouge : sols à pH acides, en jaune : sols à pH neutres, en bleu : sols à pH basiques/alcalins et en noir : sols pour lesquels les données sont manquantes

Source : Wikipédia

A



B



Figure 3 : Chlorose internervaire induite par la carence en fer chez le citronnier.

A Feuille non carencée

B Feuille carencée en fer

La disponibilité du fer dans le milieu est souvent limitante

Le problème de la carence en fer touche à la fois le règne animal et le règne végétal. Nous nous intéressons plus particulièrement aux espèces végétales qui constituent la base de l'alimentation de nombreuses espèces animales.

Pour les végétaux, la concentration en fer optimale dans le sol se situe entre 10^{-9} et 10^{-4} M (Guerinot and Yi, 1994). Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre. L'ion ferreux Fe^{2+} est relativement soluble dans les sols mais il est oxydé en Fe^{3+} par l' O_2 . En milieu aérobie, on trouve le fer majoritairement sous forme d'oxydes ferriques (FeOOH) dont la disponibilité dépend très fortement du pH du sol : la solubilité de l'ion ferrique Fe^{3+} est de 10^{-17} M à pH 7 et de 10^{-6} M à pH 3,3. Notamment, le pH des sols calcaires qui constituent 30% des terres arables est tamponné à des valeurs neutres ou alcalines par la présence de carbonates de calcium. De ce fait, ces terres présentent une quantité de fer disponible insuffisante (Figure 2).

Chez la plante, une carence en fer provoque une forte diminution de la concentration en chlorophylle des feuilles. Ainsi, le jaunissement des régions inter-nervures des jeunes feuilles est le premier symptôme visible qu'une plante souffre d'une carence en fer : ce symptôme est appelé chlorose (Figure 3). En diminuant la photosynthèse, la carence en fer engendre une diminution importante du rendement de certaines cultures. De plus, les végétaux sont à la base de l'alimentation humaine et le point d'entrée des apports en fer. Les quantités en fer dans les végétaux consommés sont inférieures à celles qui se trouvent dans les aliments d'origine animale. En outre, des composés végétaux comme les tannins, les polyphénols et les phytates chélatant le fer réduisent sa disponibilité donc son accès au système digestif (Gilloly *et al.*, 1983). Or l'alimentation de base d'une grande partie de la population se résume à des plantes. Selon WHO, actuellement 2 milliards de personnes sont anémiques et leur anémie est souvent due à une carence en fer (Figure 4).

L'une des stratégies proposées pour endiguer la carence en fer humaine autrement que par des compléments alimentaires est la biofortification des plantes cultivées. Cette stratégie nécessite l'obtention de plantes accumulant, dans les parties consommées, des quantités supérieures et plus disponibles d'oligoéléments dont le fer (Bouis, 2003).

L'amélioration des rendements agricoles en conditions de carence en fer, tout comme la mise en œuvre de la biofortification impliquent une meilleure compréhension des

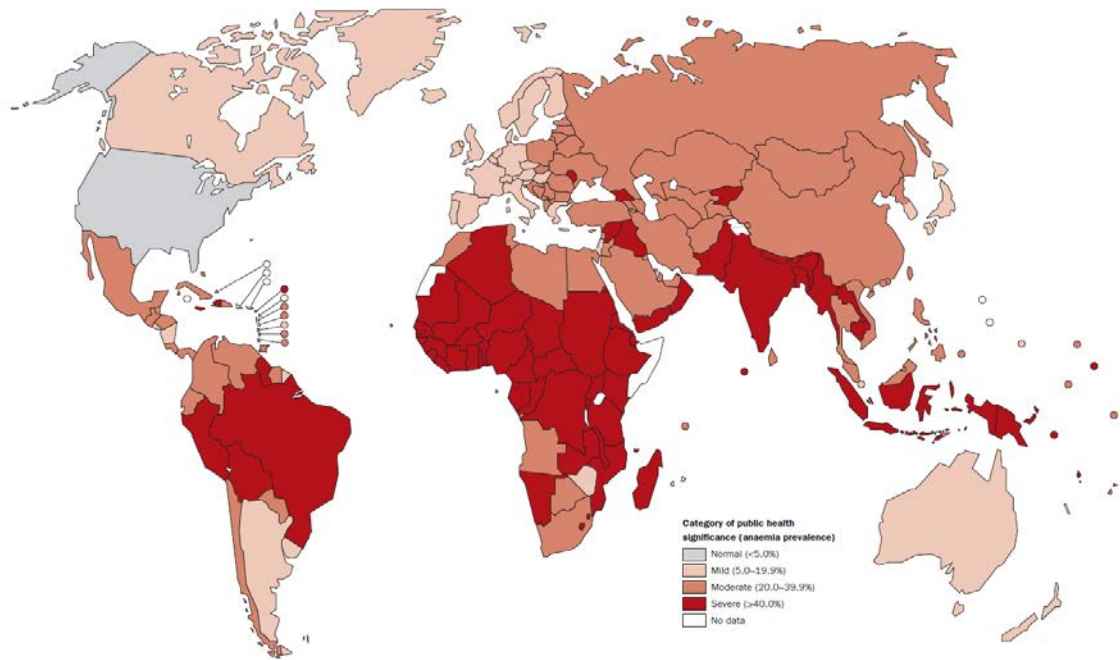


Figure 4 : Carte du monde de l'anémie touchant les enfants âgés de 0 à 5 ans avec une échelle de couleur selon la sévérité du problème de santé publique.

En gris, les pays où l'anémie n'est pas un problème de santé publique, en rouge clair, le problème est léger, en rouge, le problème est modéré, en rouge foncé, le problème est sévère, en blanc, les pays pour lesquels les données manquent

Source : WHO database

mécanismes d'absorption et de gestion de l'homéostasie du fer chez les plantes. La communauté scientifique s'est intéressée aux processus d'acquisition du fer, de son transport à longue distance, de son utilisation dans les organes, de son stockage pour éviter la production de ROS, de sa mobilisation vers des organes puits tel que la graine. La graine est l'organe le plus consommé des plantes cultivées. Son contenu en fer et la biodisponibilité de celui-ci sont importants pour l'alimentation humaine et animale.

Ces paramètres sont également importants au cours de la germination, pendant l'émergence des plantules de la génération suivante lorsque le sol est pauvre en fer. En effet, avant d'accéder aux contenus en fer du sol, la graine utilise ses propres stocks de fer qu'elle doit être capable de mobiliser efficacement.

Mécanismes de transfert du fer dans la plante : du sol à la graine

Nous détaillerons l'état des connaissances actuelles en nous concentrant sur le modèle *Arabidopsis thaliana* qui est l'objet de cette thèse et pour lequel beaucoup de données sont disponibles.

Absorption

L'acquisition du fer présent dans le sol par les racines est l'un des champs où l'état des connaissances est le plus avancé. Deux stratégies sont mises en œuvre par les plantes afin d'accéder au fer du sol. Ces stratégies sont communément appelées : stratégies 1 et 2.

Arabidopsis thaliana, comme les autres dicotylédones et les monocotylédones non-graminées, utilise la stratégie 1 fondée sur la réduction du fer. Cette stratégie consiste à rendre le fer du sol disponible en acidifiant du pH de la rhizosphère par extrusion de protons de la surface de l'épiderme racinaire ainsi que *via* la sécrétion de composés phénoliques et en le réduisant en fer ferreux au voisinage de la membrane plasmique des cellules racinaires.

Lors de la carence en fer, la diminution de pH permet de dissoudre les précipités de Fe^{3+} ($\text{Fe}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$). Cette acidification met en jeu un efflux de protons (H^+) par des pompes H^+ -ATPases. Chez *Arabidopsis*, l' H^+ -ATPase AtAHA2 joue un rôle majeur dans l'acidification de la rhizosphère en réponse à la carence en fer (Santi and Schmidt, 2009 et Palmgren, 2001).

En conditions de carence en fer, la production racinaire de coumarines est augmentée par une induction de la voie de biosynthèse des acides phénoliques (Rodríguez-Celma *et al.*,

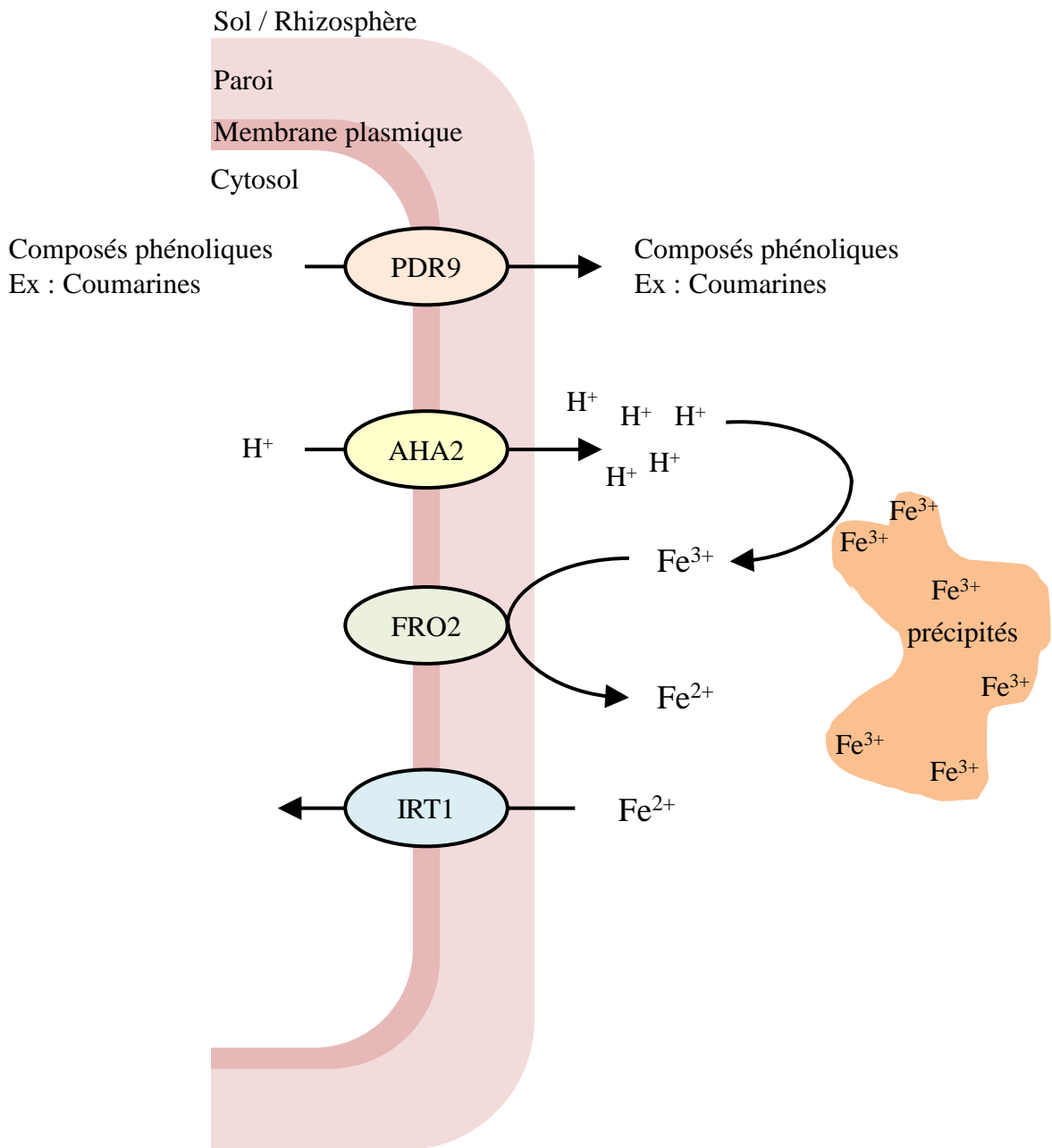


Figure 5 : Schéma d'une cellule d'épiderme racinaire illustrant les étapes de la stratégie 1 d'acquisition du fer : avec les quatre étapes : sécrétion de composés phénoliques, acidification, réduction et absorption.

PDR9 : Pleiotropic Drug Resistance 9 , ATP-Binding Cassette family transporter

AHA2 : H⁺-ATPases

FRO2 : NADPH dependant Ferric Reductase Oxidase 2

IRT1 : Iron-Regulated Transporter 1, ZIP family transporter

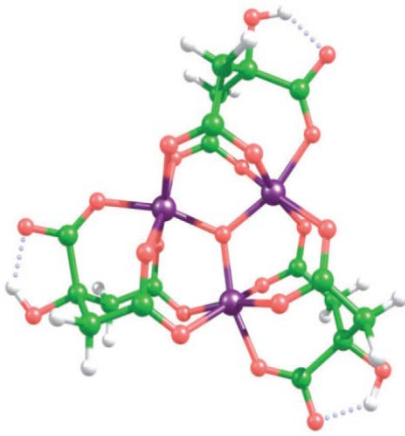
2013, Schmidt *et al.*, 2014 et Schmid *et al.*, 2014). Notamment l'expression de la Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase 1 (F6'H1), une enzyme clef de cette voie, est induite par la carence en fer chez *Arabidopsis thaliana*. Fourcroy *et al.* (2014) ont mis en évidence l'importance du transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) PDR9 (Pleiotropic Drug Resistance 9), également induit par la carence en fer, dans la sécrétion de ces composés phénoliques chez *Arabidopsis* (Figure 5).

Le fer ainsi solubilisé est ensuite réduit de fer ferrique en fer ferreux par la réductase de chélats ferriques racinaire AtFRO2 (ferrique réductase NADPH dépendante) (Robinson *et al.*, 1999, Connolly *et al.*, 2003). Les mutants *fro2* ou *frd1-1* ne présentent pas d'augmentation d'une activité réductase de chélate ferrique en conditions de carence en fer et présentent des symptômes de chlorose plus importants que ceux des génotypes sauvages (Yi and Gueriot, 1996).

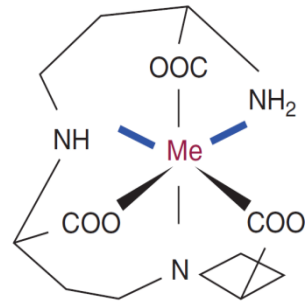
Le fer est enfin transporté au travers de la membrane plasmique sous la forme Fe^{2+} dans la racine *via* AtIRT1 (Iron Regulated Transporter 1), une protéine appartenant à la famille de transporteurs nommée ZIP (ZRT (Zinc Regulated Transporter), IRT-like Protein) (Eide *et al.*, 1996, Varotto *et al.*, 2002, Vert *et al.*, 2002). Le mutant *irt1-1* présente un phénotype nain, chlorotique et stérile qui peut être corrigé par un apport de fer « généreux ». AtIRT1 transporte le Fe^{2+} mais également d'autres métaux sous la forme de cations divalents. La faible sélectivité d'AtIRT1 peut s'avérer dangereuse si cette protéine séjourne sur la membrane plasmique de manière prolongée ou en trop grande quantité. En effet, le cadmium et le fer peuvent se retrouver en compétition pour un transport *via* AtIRT1 (Eide *et al.*, 1996). La localisation de la protéine AtIRT1 a tout d'abord été décrite à la membrane plasmique des cellules de l'épiderme et du cortex (Vert *et al.*, 2002). En 2011, Barberon *et al.* ont démontré qu'AtIRT1 a une localisation dynamique entre les endosomes précoces, la membrane plasmique et la vacuole permettant de réguler finement la quantité de cette protéine au niveau de la membrane plasmique. Le retrait d'AtIRT1 de la membrane plasmique qui aboutit à sa dégradation au sein de la vacuole est activé par mono-ubiquitination sur des résidus lysines.

La figure 5 récapitule les différentes étapes de la réponse à la carence en fer. Les quatre étapes (sécrétion de composés phénoliques, acidification, réduction et import) sont induites *via* l'augmentation des transcrits des protéines nécessaires donc par l'intervention de régulateurs transcriptionnels. Plusieurs facteurs de transcriptions de la famille des bHLH (basic Helix-Loop-Helix) ont été impliqués dans les réponses à la carence en fer. AtFIT (FER-like Iron

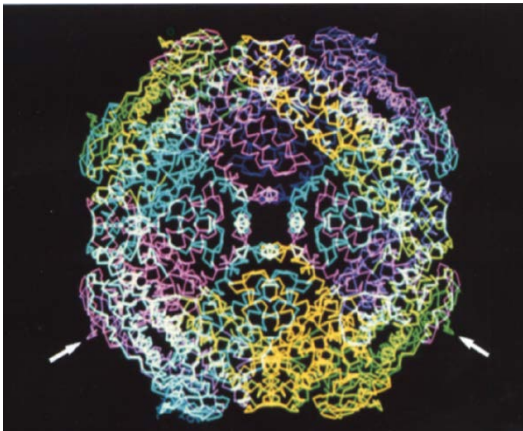
A



B



C



D

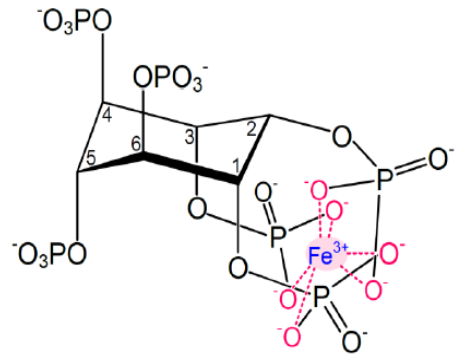


Figure 6 : Structure de différents ligands du fer.

A Structure du citrate coordonné au fer (en violet) dans un complexe 3 citrates : 3 Fe. L'oxygène est représenté en rose, le carbone en vert et l'hydrogène en blanc.

(Tirée de Rellán-Álvarez *et al.*, 2010)

B Structure de la nicotianamine complexée à un métal (Tirée de Curie *et al.*, 2009)

C Structure quaternaire de l'apoferritine de graines de pois. Les flèches blanches indiquent les domaines terminaux spécifiques des ferritines végétales (Tirée de Briat *et al.*, 1995)

D Structure du phytate mono-ferrique où le Fe^{3+} est coordonné par six atomes d'oxygène des groupements phosphates (Tirée de Nielsen *et al.*, 2013)

deficiency Transcription factor, bHLH29) et AtbHLH38/39 régulent de manière majeure la réponse d'acquisition, alors que AtPOPEYE (bHLH47) agit au niveau du cylindre central et les AtbHLH100/101 dans les parties aériennes (Colangelo and Gueriot, 2004, Yuan *et al.*, 2008, Long *et al.*, 2010, Sivitz *et al.*, 2012).

La stratégie 2 rencontrée chez la famille des graminées est fondée sur la sécrétion de composés appelés phytosidérophores (molécules de la famille des acides muginéiques) à forte affinité pour le fer, qui, en complexe avec le fer rhizosphérique, sont transportés dans la racine. Le transporteur responsable de la sécrétion est TOM1 chez le riz ou l'orge (Nozoye *et al.*, 2011) et celui qui est responsable de l'absorption des phytosidérophores complexés au fer est YS1 chez le maïs (Curie *et al.*, 2001)

Les ligands du fer dans la plante

Après son entrée dans la cellule racinaire, le fer est distribué aux différents compartiments cellulaires pour être utilisé, stocké ou exporté vers les autres organes de la plante. Mais le fer ne circule pas sous forme libre. Il est complexé, ce qui empêche sa précipitation ou sa participation à la réaction de Fenton. Nous présenterons ici 5 ligands connus pour complexer le fer dans les plantes (Figure 6).

Le fer peut être associé au citrate. Intermédiaire du cycle de Krebs, le citrate correspond à la condensation d'un oxaloacétate avec un cycle acétylCoA. Ce composé est souvent accumulé dans des plantes carencées en fer (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010).

D'autre part, le fer peut s'associer à la nicotianamine (Rellán-Álvarez *et al.*, 2008). Cet acide aminé non protéinogène peut complexer, selon le pH, le Fe^{2+} ou le Fe^{3+} . Le fer associé à la nicotianamine n'est plus disponible pour la réaction de Fenton. La nicotianamine est le précurseur des phytosidérophores de la famille DMA (2'-deoxymugineic acid).

Le fer peut également s'associer au phosphate sous la forme de phytate ou myo inositol hexakisphosphate. Le phytate est la principale forme de stockage du phosphate dans la graine (Raboy, 2009) où il forme des précipités avec le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le K^{+} mais également des métaux comme le Fe^{2+} , le Zn^{2+} et le Mn^{2+} (Otegui *et al.*, 2002, Bruch *et al.*, 2015). Cependant ses propriétés de chélation très forte du fer empêchent l'absorption intestinale de ce métal et ont conduit à classer cette molécule comme antinutriments dans l'alimentation animale.

Racine : chargement du xylème

Feuille : déchargement du xylème

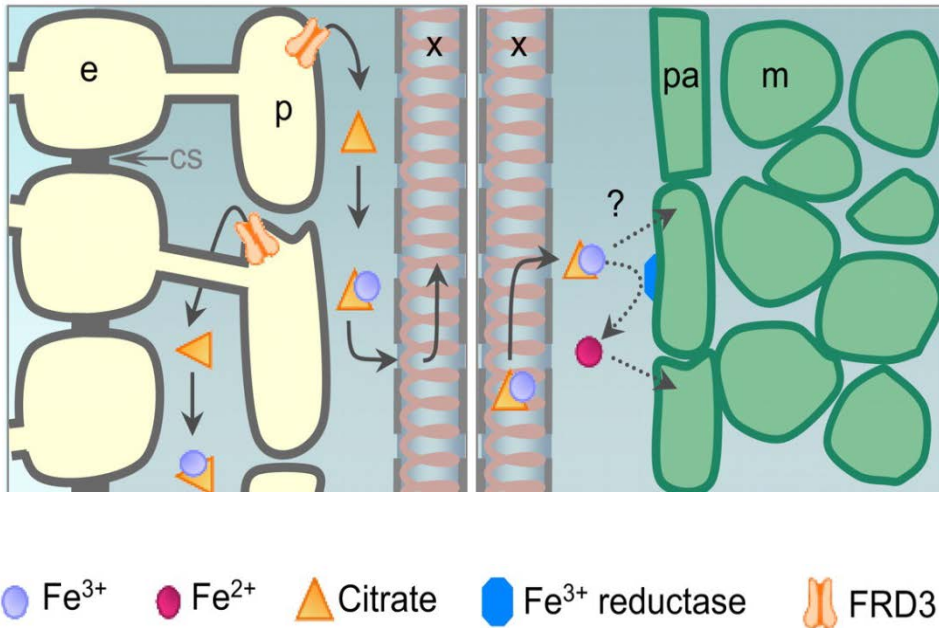


Figure 7 : Le transporteur AtFRD3 est impliqué dans la distribution du fer entre les racines et les parties aériennes par chargement et déchargement du citrate dans et depuis le xylème

e : endoderme
 p : péricycle
 x : xylème
 pa : parenchyme
 m : cellule du mésophylle
 CS : cadre de Caspari

(Illustrations tirées de Roschztardtzt *et al.*, 2011)

Au sein des plastes, le fer est stocké en grande quantité sous forme de ferritine. Cette protéine multimérique peut piéger jusqu'à 4500 atomes de fer sous forme Fe^{3+} non toxique et rapidement accessible (Bienfait and Van der Briel, 1980, Theil, 1987, Laulhère *et al.*, 1990).

Les ions métalliques sont utilisés comme cofacteurs de nombreuses protéines (un tiers des protéines des cellules eucaryotes et procaryotes). Afin que l'ion métallique parvienne à la bonne protéine, au bon endroit, au bon moment, il existe des protéines liant spécifiquement des métaux et les délivrant aux enzymes cibles par interaction protéine-protéine (Frey *et al.*, 2014). Dans les cellules humaines, des protéines d'interaction poly(rC) dites « adaptatrices multifonctionnelles » nommées PCBP1 et PCBP2 sont des chaperonnes du fer. Elles facilitent notamment l'intégration de ce métal dans la ferritine (Frey *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a été proposé que la frataxine joue un rôle de chaperonne du fer dans la mitochondrie. La frataxine serait responsable de la protection des clusters $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ et activerait l'activité enzymatique de l'aconitase (Bulteau *et al.*, 2004). Initialement identifiée chez l'homme car des mutations dans le gène qui la code causent des maladies génétiques graves, la frataxine, a des homologues chez la levure et chez les plantes (Bencze *et al.*, 2006). Par contre, les génomes végétaux ne contiennent pas d'homologues de PCBP et la présence de ce type de chaperonne n'est que suspectée chez les plantes.

Transport longue distance : des racines aux parties aériennes

Après son entrée dans les cellules épidermiques *via* AtIRT1, le fer rejoint le xylème racinaire en cheminant des cellules de l'épiderme jusqu'au péricycle par voie symplastique (*continuum* intracellulaire créée par les plasmodesmes), peut-être par diffusion le long d'un gradient de concentration (Marschner, 1995). Le mouvement vers les parties apicales est permis par le flux transpiratoire (Morrissey and Guerinot, 2009). Au sein du xylème, le fer est associé au citrate sous forme de fer ferrique. Le pH acide du xylème permet l'existence du complexe citrate- Fe^{3+} de manière stable (Roschztardtzt *et al.*, 2011). Le transporteur AtFRD3 (Ferric Reductase Defective 3) appartenant à la famille de transporteurs MATE (Multidrug And Taxin Extrusion) (Figure 7) permet l'efflux de citrate vers le xylème et la solubilisation du fer dans l'apoplasme autour des tissus vasculaires (Durett *et al.*, 2007, Roschztardtzt *et al.*, 2011). Chez les mutants *frd3*, le fer s'accumule sous forme de précipités dans les parois et les réponses à la carence en fer sont constitutivement activées (Rogers and Guerinot, 2002, Green and Rogers, 2004).

Les mécanismes permettant le chargement du fer dans le xylème ne sont pas encore complètement élucidés. Sur la base du patron d'expression limité au cylindre central et de sa localisation à la membrane plasmique, Morrissey *et al.* (2009) ont proposé que le transporteur AtIREG1/FPN1 (Iron Regulated 1/Ferroportin1) homologue de la ferroportine impliquée dans le transport du fer chez les mammifères joue un rôle dans l'efflux de fer vers le xylème. Cependant, à la différence du mutant *frd3*, le mutant *fpn1* ne montre pas de symptôme de carence en fer. Ceci indique l'existence d'autres mécanismes permettant le chargement du fer dans le xylème.

Distribution dans les tissus

Le transport à longue distance par le xylème permet au fer d'atteindre les organes chlorophylliens. Les cellules photosynthétiques ont des besoins particulièrement élevés en fer notamment au niveau des chloroplastes qui participent à la synthèse des hèmes et des clusters fer-soufre et surtout abritent la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique.

L'étude des plantes dépourvues de nicotianamine a montré un rôle important de la nicotianamine dans la distribution latérale du fer au sein des feuilles. En effet, le mutant de tomate *chloronerva*, les tabacs transgéniques surexprimant la nicotianamine amino transférase (NAAT) et les triple et quadruple mutants de nicotianamine synthase (NAS) d'*Arabidopsis* montrent des phénotypes de chlorose internervaire très marqués (Ling *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 2003, Klatte *et al.*, 2009, Schuler *et al.*, 2012). Il a été proposé que le transporteur AtYSL2, capable de transporter les complexes fer-nicotianamine, soit impliqué dans la sortie du fer depuis le xylème permettant ainsi sa distribution latérale aux cellules voisines (DiDonato *et al.*, 2004, Schaaf *et al.*, 2005).

Il est admis que l'entrée du fer dans les cellules des organes aériens se fait par un mécanisme similaire à son absorption au niveau des racines -soit en deux étapes-: réduction et influx de fer ferreux. En faveur de ce modèle, une réductase ferrique NADPH dépendante AtFRO6 est fortement exprimée dans les feuilles (Mukherjee *et al.*, 2006). Sa capacité à réduire le fer foliaire a été démontrée par surexpression dans les feuilles de tabac (Li *et al.*, 2011). Cependant son expression n'est pas dépendante du statut de carence ou suffisance en fer de la plante (Mukherjee *et al.*, 2006). Le transporteur AtIRT3 capable de transporter à la fois le zinc et le fer et localisé à la membrane plasmique a été proposé comme candidat pour l'étape d'influx de fer ferreux (Lin *et al.*, 2009).

Distribution intracellulaire

Dans les cellules de feuilles d'*Arabidopsis*, photosynthétiquement actives, plus de 90% du fer est contenu dans les chloroplastes et environ 35% du fer chloroplastique est associé aux thylakoïdes dont environ la moitié est sous forme de clusters 4Fe-4S dans le photosystème I (Abdel-Ghany *et al.*, 2005, Shingles *et al.*, 2002). Cette partie se focalisera sur les mécanismes permettant la régulation du contenu en fer des chloroplastes, même s'il est clair que des systèmes permettant la distribution du fer aux autres organites ont aussi leur importance.

Les mécanismes permettant l'entrée de fer dans le chloroplaste ne sont à ce jour pas totalement élucidés. Avant son entrée dans les plastes, le fer serait réduit par une réductase. En faveur de ce modèle, AtFRO7, une réductase ferrique NADPH-dépendante homologue d'AtFRO2 et AtFRO6, est localisée dans les enveloppes des chloroplastes. Les chloroplastes du mutant *fro7* ont une activité de réduction du fer diminuée et un contenu en fer réduit. Sur milieu carencé, ce mutant présente une chlorose (Jeong *et al.*, 2008).

Plusieurs candidats ont été proposés pour permettre l'entrée du fer dans le chloroplaste. La perméase PIC1 (Permease in the Innner envelope of the Chloroplast 1) est localisée dans l'enveloppe des chloroplastes et montre une activité de transport de fer lorsqu'elle est exprimée chez la levure. En accord avec le rôle proposé de PIC1, le mutant *pic1* présente un défaut de formation des chloroplastes, un nanisme extrême et une très forte chlorose. Les surexprimeurs de PIC1 accumulent plus de fer dans leurs chloroplastes (Duy *et al.*, 2007, 2013). PIC1 fonctionnerait en association avec la protéine NiCo (transporteur putatif de nickel et de cobalt) sur la membrane interne du chloroplaste (Duy *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a également été proposé que le transporteur AtNAP14 (Non-intrinsic ABC Protein 14), identifié par homologie avec un transporteur cyanobactérie (FutC), participe à l'import de fer au sein du chloroplaste. AtNAP14 est localisée dans les chloroplastes (Shimoni-Shoor *et al.*, 2010). Comme le mutant *pic1*, le mutant *nap14* est nain, présente un défaut de formation des chloroplastes, est totalement dépourvu de chlorophylle et accumule le fer dans les parties aériennes (Shimoni-Shoor *et al.*, 2010).

Enfin, AtMAR1 (Multiple Antibiotic Resistance 1) a aussi été proposé comme porte d'entrée du fer chloroplastique. Cette protéine présente une homologie avec la ferroportine

qui est impliquée dans le transport du fer chez les mammifères et est localisée dans les membranes des chloroplastes. Elle a initialement été identifiée dans un crible de résistance à des antibiotiques agissant dans les plastes. En accord avec le rôle de AtMAR1 dans le transport chloroplastique du fer, le mutant *mar1* est légèrement chlorotique et ce phénotype peut être atténué par l'ajout de fer dans le milieu (Conte *et al.*, 2009).

Le contenu en fer des chloroplastes peut également être contrôlé par l'efflux de ce métal. AtYSL6, un transporteur putatif de complexe fer-nicotianamine, est localisé à l'enveloppe chloroplastique (Divol *et al.*, 2013). Les protéines YSL (Yellow Stripe-like) sont les homologues de YS1 (Yellow Stripe 1), transporteur du complexe Fe(III)-phytosidérophore chez le maïs. AtYSL6 et son homologue AtYSL4 sont induits par l'excès de fer et agissent de concert afin de prévenir une suraccumulation du fer au sein de chloroplastes (Divol *et al.*, 2013). En effet, le contenu en fer chloroplastique est plus élevé chez le double mutant *ysl4ysl6* ce qui se traduit par une hypersensibilité de ce mutant à l'excès de fer. En désaccord avec ces données, Conte *et al.* en 2013 ont publié des localisations tonoplastiques de AtYSL4 et AtYSL6 et une hypersensibilité du double mutant à l'excès de manganèse.

Mobilisation des organes sources vers les organes puits

Depuis les organes sources que sont les feuilles vers des organes puits, le mouvement du fer se fait *via* le phloème sous forme de complexe avec la nicotianamine. Les propriétés de chélation du fer par la nicotianamine sont maximales à pH neutre ou alcalin ce qui correspond aux conditions rencontrées dans le phloème. De nombreux arguments indiquent que ce processus fait intervenir des transporteurs de type YSL appartenant à la famille OPT (OligoPeptide Transporteur).

Le quadruple mutant *nas4x-2* où les 4 gènes d'*Arabidopsis* codant pour les NAS sont interrompus présente une accumulation du fer dans le phloème suggérant que la nicotianamine est requise pour la mobilisation du fer phloémien plutôt que pour le mouvement du xylème vers le phloème (Schuler *et al.*, 2012). Chez ce même quadruple mutant *nas4x-2*, la quantité de fer dans les graines est diminuée (Klatte *et al.*, 2009).

AtYSL1, AtYSL2 et AtYSL3 jouent des rôles dans le transport à longue distance du fer et d'autres métaux. Elles sont impliquées dans le transport de la nicotianamine (NA) seule ou des complexes métal-nicotianamine (Schaaf *et al.*, 2004, DiDonato *et al.*, 2004, Curie *et al.*, 2009). Ces transporteurs sont localisés sur la membrane plasmique (Curie *et al.*, 2009).

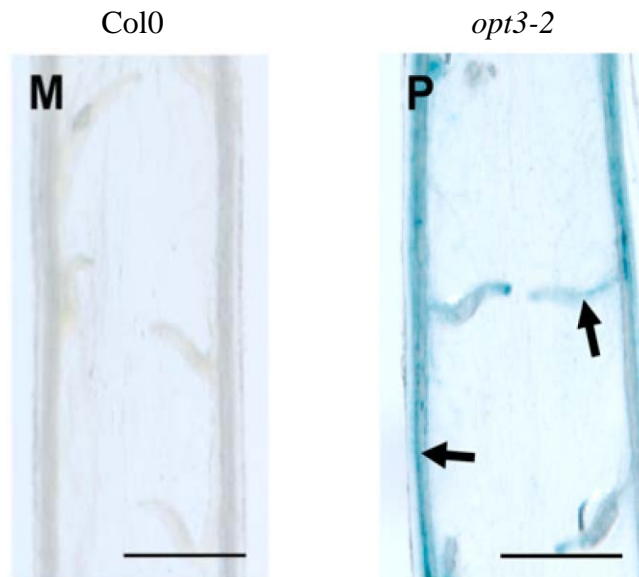


Figure 8 : Le transporteur AtOPT3 est impliqué dans la distribution du fer à l'embryon
Coloration du Fe^{3+} à l'aide de la coloration Perl's chez le WT et le mutant *opt3-2*
(Tirée de Stacey *et al.*, 2008)

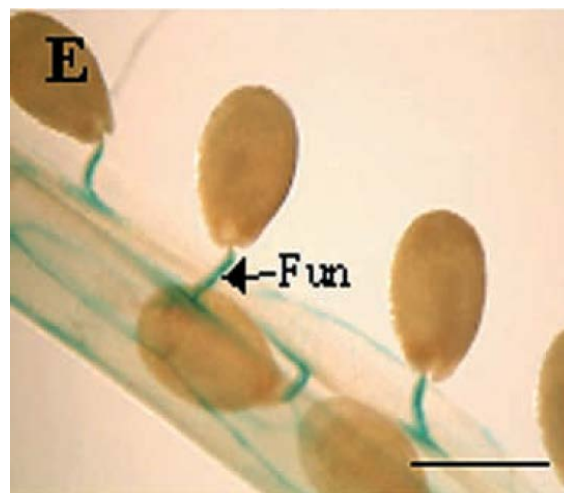


Figure 9 : Les tissus vasculaires maternels sont interrompus à l'extrémité du funicule et ne sont pas connectés à l'embryon en développement. Le phloème maternel est visualisé grâce au gène rapporteur GUS de la construction *PromoteurOPT3::GUS* dans la silique et les funicules.

Fun = funicule

Barre d'échelle = 0,5 mm

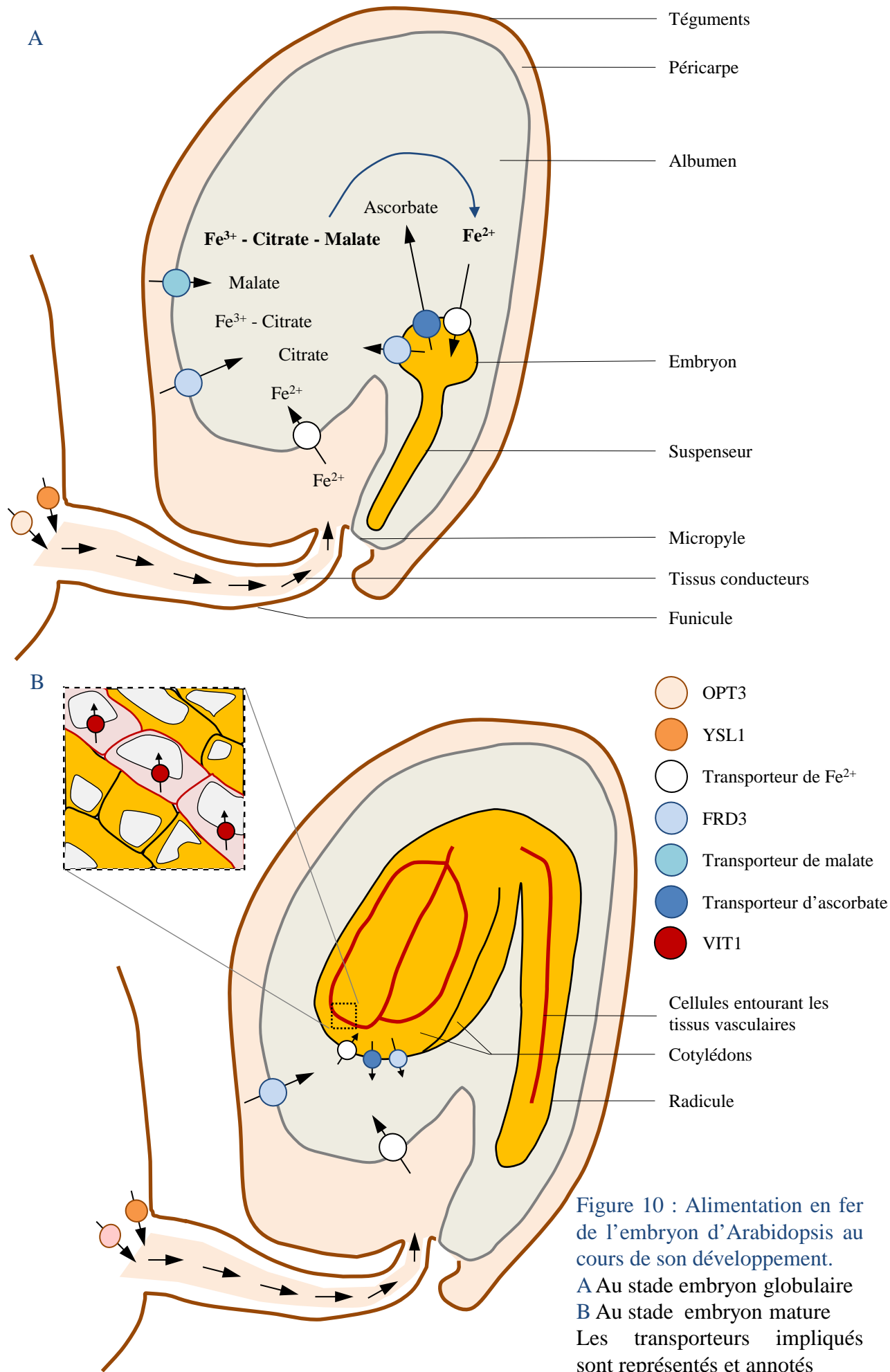
(Tirée de Stacey *et al.*, 2002)

Leur expression dans les tissus vasculaires suggère qu'ils pourraient permettre l'influx de métaux dans les cellules compagnes du phloème et dans les cellules des parenchymes adjacents, et l'efflux hors du xylème. Chez le mutant *ysl1* et le double mutant *ysl1ysl3*, les concentrations en fer, en zinc et en cuivre dans les feuilles et les graines sont diminuées. Ces phénotypes sont symptomatiques d'un défaut de remobilisation des métaux durant la sénescence foliaire (Le Jean *et al.*, 2005, Waters *et al.*, 2006, Waters and Grusak, 2008, Chu *et al.*, 2010). Ainsi AtYSL1 et AtYSL3 sont deux transporteurs membranaires impliqués dans la remobilisation du fer vers les graines.

Il a été proposé que le transporteur AtOPT3 participe à l'import du fer dans la graine (Stacey *et al.*, 2008). OPT3 est localisé sur la membrane plasmique et son expression permet de restaurer la croissance chez le mutant de levure $\Delta fet3fet4$ affecté dans l'absorption du fer (Zhai *et al.*, 2014). Le substrat transporté par AtOPT3 reste inconnu. Cependant son appartenance à la même famille que les YSL laisse penser qu'AtOPT3 pourrait transporter du fer sous forme complexé. Une perte de fonction complète du gène *AtOPT3* (mutant *opt3-1*) provoque une létalité embryonnaire (Stacey *et al.*, 2002). Chez le mutant *opt3-2* qui présente une réduction d'expression résultant de l'insertion de l'ADN-T dans la région promotrice, la quantité de fer dans les graines est réduite (Stacey *et al.*, 2008). Le gène *AtOPT3* est activé en conditions de carence en fer (Stacey *et al.*, 2002, 2006). De plus, chez le mutant *opt3-2*, les systèmes racinaires de réduction (*AtFRO2*) et d'import (*AtIRT1*) sont constitutivement activés alors que de fortes quantités de fer sont accumulées dans les feuilles suggérant une fonction dans la signalisation de la carence en fer (Stacey *et al.*, 2008). Des données récentes montrent qu'AtOPT3 est impliqué dans le chargement du fer dans le phloème et facilite la recirculation du fer du xylème au phloème (Zhai *et al.*, 2014, Mendoza-Cózatl *et al.*, 2014). En accord avec un rôle dans le déchargement du fer du phloème, le fer s'accumule dans les tissus vasculaires de la silique chez le mutant *opt3-2* (Figure 8). Cette fonction pourrait rendre compte des phénotypes du mutant *opt3-2* en altérant la remobilisation du fer vers les graines et en empêchant la recirculation vers les racines de complexes de fer jouant un rôle de signalisation dans la carence en fer (Stacey *et al.*, 2008, Garcia *et al.*, 2013).

Entrée dans la graine

La graine est l'un des organes puits les plus importants de la plante. Elle est composée de l'embryon, de l'albumen (tissus issus de la fécondation) et des téguments (tissus maternels). Chez *Arabidopsis thaliana*, la graine est dite exalbuminée : l'albumen qui contient



l'essentiel des réserves chez les graines d'autres espèces est consommé au cours de la formation de la graine et l'organe de stockage des réserves devient l'embryon lui-même et ses cotylédons. La croissance de l'embryon se déroule en même temps que l'entrée des nutriments. Le fer y est alors stocké sous une forme stable et mobilisable durant la germination.

Le fer de la graine d'*Arabidopsis* peut avoir deux provenances : l'absorption à partir de la racine pendant la formation de la graine et la remobilisation à partir des feuilles sénescentes. Les contributions relatives de ces deux voies ont été estimées par Waters and Grusak en 2008. Ainsi 60-70% du fer de la graine proviendrait du xylème donc de l'acquisition racinaire alors que les 30-40% restants sont issus de la remobilisation à partir des organes sources (voir «*Mobilisation des organes sources vers les organes puits* »).

Le transport des nutriments jusqu'aux embryons en développement est un processus dont on ne connaît pas encore toutes les étapes moléculaires. Il doit comporter des influx et efflux au travers de membranes plasmiques vu qu'il n'y a pas de connexion vasculaire entre l'embryon et les tissus maternels. Seuls les tissus maternels composant la graine, les téguments, sont connectés aux systèmes vasculaires de la plante mère. Le contexte de la silique fait cependant que les graines et leurs téguments se trouvent à proximité de vaisseaux conducteurs au niveau du funicule (Figure 9) donc à la fois du xylème et du phloème, sans y être directement reliés. Ainsi, afin de rejoindre l'albumen puis l'embryon, les nutriments doivent être déchargés du phloème dans les téguments. Ce stock tégumentaire rejoint ensuite l'albumen puis sera absorbé par les tissus filiaux (Walker and Waters, 2011).

Les mécanismes permettant l'acquisition du fer par l'embryon commencent juste à être mis en évidence. Dans le liquide du sac embryonnaire de la graine de pois en développement à partir duquel le fer est absorbé par l'embryon, le fer est présent sous forme de complexes Fe(III)-citrate et Fe(III)-malate (Grillet *et al.*, 2013). Cela suggère qu'il existe une étape de réduction du fer précédant son absorption par l'embryon. Grillet *et al.* (2013) ont montré que cette étape de réduction est réalisée par l'ascorbate sécrété par l'embryon (Figure 10). En effet, les embryons de pois ou d'*Arabidopsis* isolés ont une forte capacité de réduction ferrique assurée par un efflux d'ascorbate. En accord avec ce mécanisme, les mutants *vtc2* et *vtc5* (pour *vitamin c*), déficients dans une des dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate, présentent une activité de réduction réduite et des contenus en fer diminués dans la graine. Le transporteur responsable de l'efflux d'ascorbate par l'embryon et le transporteur

Promoteur *AtVIT1*:: GUS

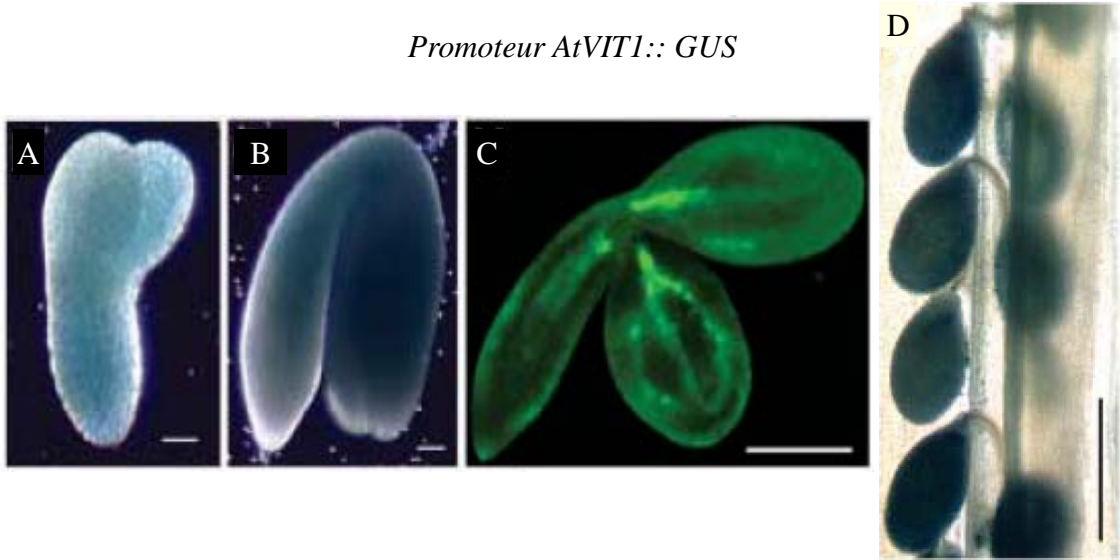


Figure 11 : Patron d'expression du gène *AtVIT1* mise en évidence par coloration GUS (A, B et D) et par imagerie de la fluorescence de «ImaGene Green™ C₁₂FDGlcU» (C). Les barres d'échelle représentent 100 µm (A, B, C) et 1 mm (D). (Images tirées de Kim *et al.*, 2006)

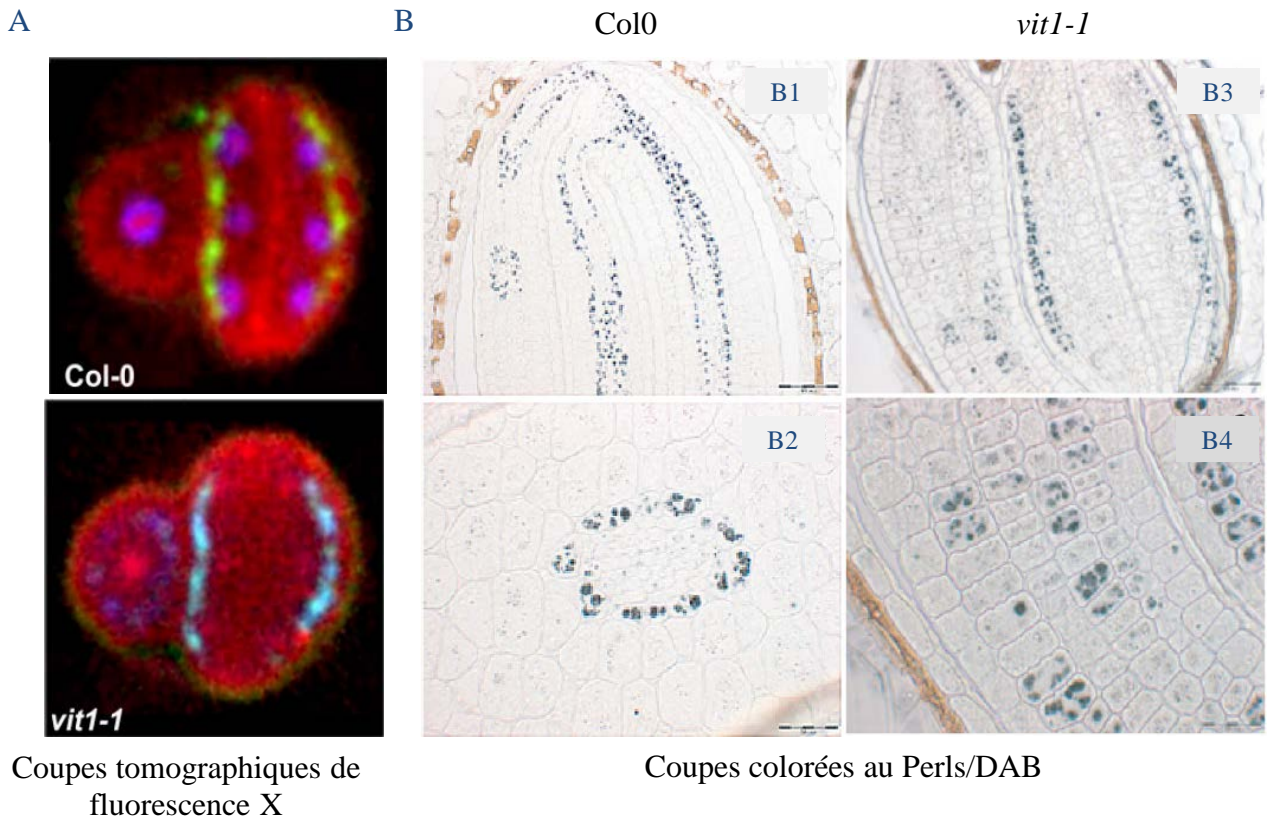


Figure 12 : Répartition du fer dans les embryons du mutant *vit1-1* en comparaison avec le sauvage.

A Coupes issues des microtomographies en fluorescence X des embryons de Col0 et *vit1-1* avec en rouge, le zinc, en vert, le manganèse et en bleu, le fer (soit une co-localisation du fer et du zinc pour le violet, et une co-localisation du fer et du manganèse pour le bleu clair). (Tirées de Kim *et al.*, 2006)

B Couples d'embryons de Col0 et de *vit1-1* colorés au Perls/DAB : vue de l'embryon entier en coupe longitudinale en B1 et B3 (barre d'échelle : 50 µm) et de la radicule en coupe transversale en B2 et en couple longitudinale en B4 (barre d'échelle : 20 µm).

(Tirées de Roschttardt *et al.*, 2009)

d'entrée du Fe(II) dans l'embryon restent à identifier. L'analyse de la spéciation du fer dans le liquide de son sac embryonnaire indique que le fer est fourni sous forme de complexe avec du malate et du citrate. Le transporteur FRD3 (voir « *Transport longue distance : des racines aux parties aériennes* ») est exprimé dans les couches cellulaires externes de l'embryon et des téguments faisant face au milieu entourant l'embryon en développement (Roschztardt et al., 2011). Ce patron d'expressions suggère que FRD3 pourrait être responsable de l'efflux de citrate nécessaire à la complexation du fer dans l'albumen (Figure 10). En revanche, aucune donnée n'est disponible concernant le mécanisme d'efflux de malate vers l'albumen. Un canal ionique de la famille ALMT (Aluminium-activated Malate Transporter) pourrait être impliqué (Barbier-Brygoo et al., 2011).

Stockage dans la graine

Les stocks de fer ne sont pas répartis de manière homogène dans l'embryon chez *Arabidopsis* (Kim et al., 2006, Roschztardt et al., 2009, Ramos et al., 2013), chez le riz (Johnson et al., 2011, Takahashi et al., 2009), ou encore chez le haricot (Cvitanich et al., 2010).

Au sein de l'embryon, le fer peut être stocké dans les plastes sous la forme de complexe avec la ferritine. Chez le pois, la ferritine est la forme principale de stockage du fer au stade graine (Lobréaux and Briat, 1991, Marentes and Grusak, 1998). Chez *Arabidopsis*, le seul gène de ferritine exprimé au cours de la formation de la graine est *AtFER2*. La protéine *AtFER2* s'accumule dans les graines matures une fois que la silique a atteint son contenu en fer maximal (Ravet et al., 2009b). Néanmoins, l'étude du mutant perte de fonction *fer2* indique que 5% au plus du contenu total en fer de la graine d'*Arabidopsis* est associé à la ferritine *AtFER2* (Ravet et al., 2009a).

Le fer peut aussi être stocké dans la vacuole. Ainsi la majorité du fer serait associé au phytate sous forme de précipités vacuolaires dans des compartiments vacuolaires nommés globoïdes (comme chez le blé, Lott and Spizer, 1980). L'étude du mutant *nramp3nramp4* affecté dans la mobilisation du fer vacuolaire (voir « *Utilisation du fer lors de la germination* ») indique qu'il constitue le principal stock de fer de la graine chez *Arabidopsis* (Lanquar et al., 2005).

Le gène *AtVIT1* code un transporteur permettant l'entrée de fer cytoplasmique dans les vacuoles (Figure 11, Kim et al., 2006, voir l'encart « *Protéines de la famille VIT1 : les*

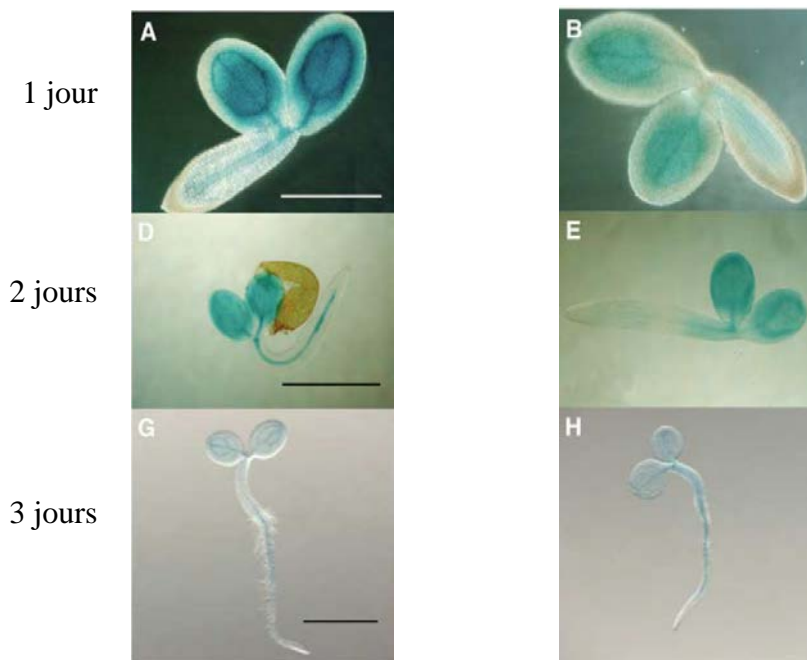


Figure 13 : Patrons d'expression des gènes *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* mise en évidence par coloration GUS.

Les plantules se développent sur un milieu carencé en fer (contenant 100 μ M de ferrozine) et sont observées à 1, 2 et 3 jours après semis. Les barres d'échelle représentent 0,5 mm pour les images prises à 1 jour, 1 mm pour celles à 2 jours et 3 mm pour celles à 3 jours. (Images tirées de Lanquar *et al.*, 2005)

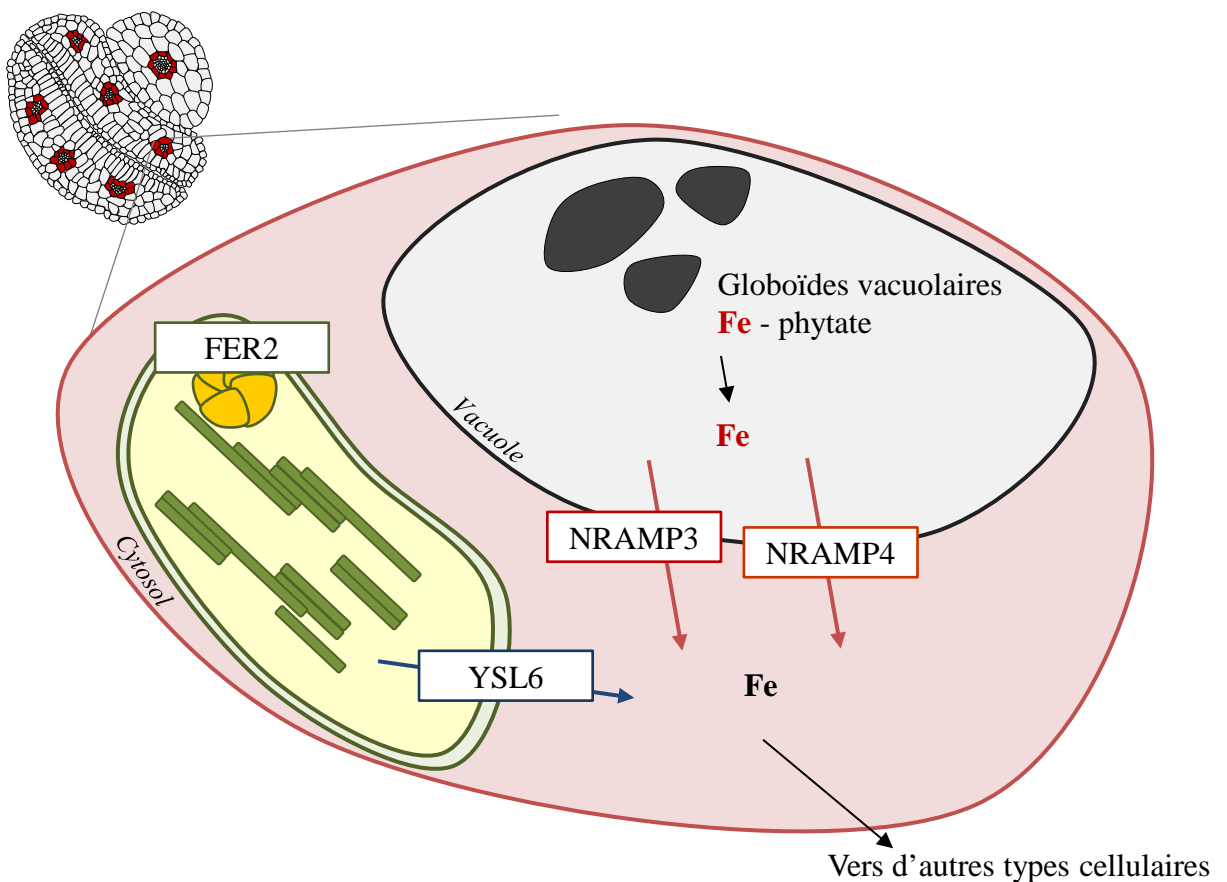


Figure 14 : Mobilisation des réserves en fer dans l'embryon.

Réserves de fer vacuolaire au sein de globoides et en fer chloroplastique associé à la ferritine 2 mobilisées par les transporteurs NRAMP3, NRAMP4 et YSL6

VTL »). L'expression du gène *AtVIT1* est maximale lors de la formation de la graine (Winter *et al.*, 2007) et focalisée au niveau des cellules périvasculaires chez l'embryon mature (Figure 11). Les embryons du mutant perte de fonction *vit1-1* présentent une altération de la distribution du fer. Alors que chez un embryon sauvage, le fer est concentré dans les cellules entourant les faisceaux provasculaires. Le fer est localisé dans les cellules épidermiques de l'axe embryonnaire et de la face abaxiale des cotylédons chez *vit1-1* (Kim *et al.*, 2006, Roschztardt *et al.*, 2009, Figure 12). Lorsqu'on le fait germer sur un sol alcalin où le fer est faiblement disponible, le mutant *vit1-1* présente une forte chlorose et un défaut de croissance, ce qui indique que la localisation du fer autour des tissus vasculaires chez le type sauvage est importante pour une mobilisation optimale des réserves de fer (Kim *et al.*, 2006). La localisation subcellulaire du fer dans les cellules sous épidermiques du mutant *vit1-1* reste à déterminer. La coloration histologique du fer par la méthode de Perls/DAB suggère qu'il pourrait être aussi accumulé dans la vacuole dans le contexte mutant *vit1-1* (Roschztardt *et al.*, 2009) .

Les stocks de fer associés à la ferritine et ceux de la vacuole ne sont pas indépendants. Si le stockage vacuolaire est favorisé, chez les surexprimeurs de *VIT1* et chez le mutant *nramp3nramp4*, la quantité de protéine AtFER2 est diminuée (Ravet *et al.*, 2009b).

Utilisation du fer lors de la germination

Lors de la germination sur un substrat pauvre en fer, les stocks de la graine doivent être mobilisés pour assurer le développement de la jeune plantule et la mise en place de l'appareil photosynthétique. Les gènes *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) codent pour deux transporteurs impliqués dans la sortie des cations métalliques divalents et notamment de Fe^{2+} , depuis la vacuole vers le cytosol (Nevo et Nelson, 2006, Thomine *et al.*, 2003, voir l'encart « *Protéines de la famille NRAMP* »). *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* sont exprimés tout au long du cycle de développement d'*Arabidopsis*. Néanmoins, leur expression est maximale dans la graine mature et dans la graine sèche imbibée (Figure 13, Lanquar *et al.*, 2005, Winter *et al.*, 2007). Les simples mutants *nramp3* et *nramp4* ne présentent pas de phénotype par rapport au sauvage. Par contre, le double mutant *nramp3nramp4* présente une forte chlorose combinée à un arrêt développemental, liée à l'absence de remobilisation du fer stocké dans les vacuoles de l'embryon mature lors de sa germination sur un milieu pauvre en fer (Lanquar *et al.*, 2005). Les protéines AtNRAMP3 et AtNRAMP4 fonctionnent donc de manière redondante (Figure

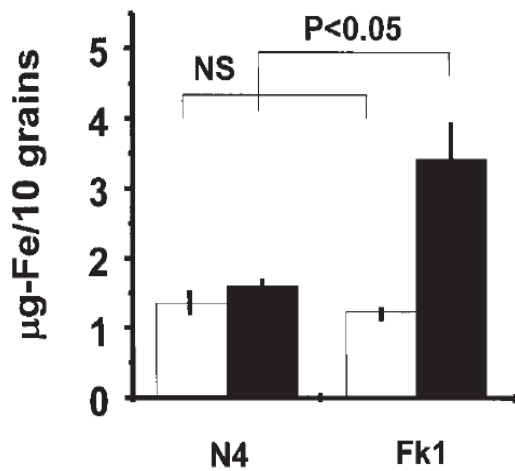


Figure 15 : Exemple de biofortication par transformation génétique.

Contenu en fer dans les graines de riz non transformées (N4)/transformées avec la ferritine de soja (Fk1)

Histogrammes blancs : embryons, histogrammes noirs : albumen

(Données tirées de Goto *et al.*, 1999)

14). Le rôle de la ferritine lors de la germination reste à clarifier. Les données disponibles suggèrent un rôle dans la tolérance au stress oxydatif (Ravet *et al.*, 2009a).

La mobilisation des stocks de fer vacuolaire pendant la germination est dépendant du fer chloroplastique. En effet, chez le mutant *ysl4ysl6* chez lequel la sortie du fer du chloroplaste est bloquée, l'expression d'*AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* est fortement inhibée (Divot *et al.*, 2013, Figure 14). De ce fait, le mutant *ysl4ysl6* mime le phénotype du mutant *nramp3nramp4* lorsqu'il germe sur un milieu pauvre en fer.

Utilisation des connaissances sur l'homéostasie du fer pour la biofortification

La biofortification peut s'appuyer sur les différences variétales existantes et les approches d'amélioration variétale classique par croisements (pour une revue détaillée voir Welch and Graham, 2004). Mais les connaissances acquises sur l'homéostasie du fer ont également permis de mettre en œuvre des approches fondées sur la construction de plantes génétiquement modifiées.

Les premières tentatives ont exploité les propriétés de stockage de la ferritine. Le contenu en fer de graines de riz a pu être augmenté d'un facteur 2 ou 3 en exprimant la ferritine de soja ou la ferritine de soja sous le contrôle d'un promoteur spécifique à l'endosperme (Goto *et al.*, 1999, Lucca *et al.*, 2001) (Figure 15). D'autres approches ont visé à augmenter la quantité de nicotianamine soit en augmentant sa synthèse, soit en réduisant sa transformation en acides muginéiques, ou encore en modifiant son transport. Ainsi en surexprimant le gène responsable de la synthèse de la nicotianamine de l'orge (*HvNAS1*), les contenus en fer et en nicotianamine dans les graines de riz sont augmentés (Masuda *et al.*, 2009). De même l'activation de la nicotianamine synthase 2 de riz par activation-tagging permet d'augmenter fortement la concentration et la biodisponibilité du fer dans le grain de riz (Lee *et al.*, 2009). La comparaison des trois gènes de riz *OsNAS1*, *OsNAS2* et *OsNAS3* a permis d'identifier *OsNAS2* comme le plus efficace pour augmenter les quantités de fer dans l'endosperme (Johnson *et al.*, 2011). La Nicotianamine Amino Transférase (NAAT) catalyse la conversion de la nicotianamine en acides muginéiques. Une mutation causant une perte de fonction du gène codant NAAT chez le riz provoque également l'augmentation de la concentration en fer dans les graines (Cheng *et al.*, 2007).

Pour finir, en combinant des transgènes avec les gènes de ferritines du soja, de la nicotianamine synthase du riz sous le contrôle de promoteurs constitutifs, ubiquitaires ou

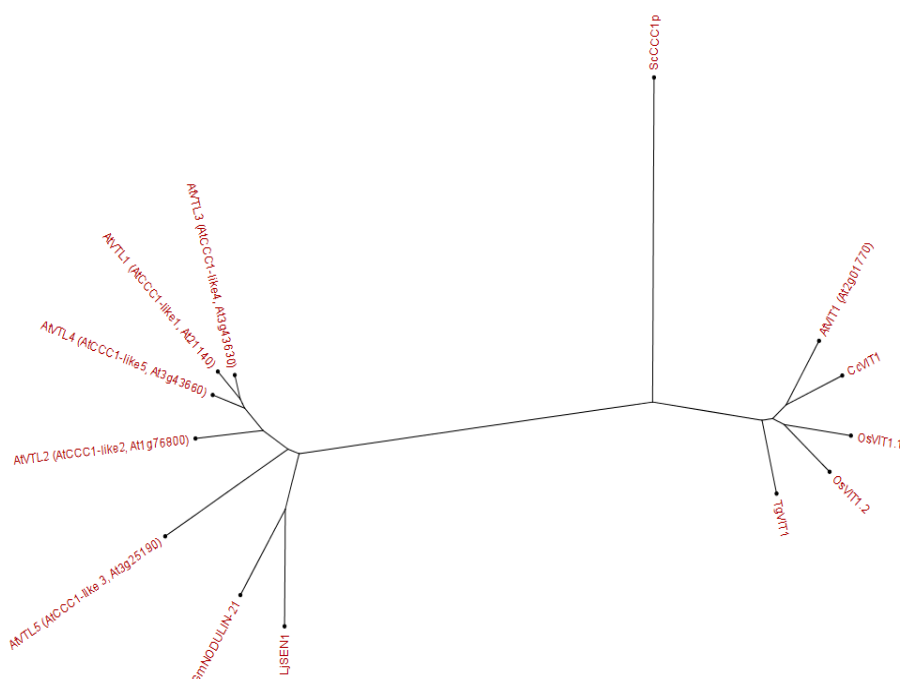


Figure 16 : Arbre phylogénétique des protéines VTL et homologues d'*Arabidopsis* (AtVIT1, AtVTL1, AtVTL2, AtVTL3, AtVTL4, AtVTL5), de riz (OsVIT1.1, OsVIT1.2), de la tulipe (TgVIT1), du soja (GmNODULIN21), du lotier (LjSEN1), du bleuet (CcVIT1) et de la levure (ScCCC1p).

Protéines de la famille VIT1 : les VTL

La fonction de la protéine VIT1 dans le stockage du fer au sein de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* a été mise en évidence par Kim *et al.* en 2006. La protéine AtVIT1 présente une forte homologie avec le transporteur de levure ScCCC1 assurant la fonction d'import du fer cytoplasmique dans la vacuole des cellules de levure. Par homologie de séquence, six autres protéines formant une famille multigénique ont été identifiées dans le génome de la plante modèle *Arabidopsis* et certains gènes de cette famille sont régulés par la disponibilité en fer. En effet, 3 gènes At1g21140, At1g76800 et At3g25190, initialement annotés comme « nodulin, putative » puis comme CCC1-like sont réprimés en conditions de carence en fer dans la racine (Schmidt and Buckhout, 2011, Gollhofer *et al.*, 2011).

Ces protéines contenant un domaine CCC1-like ont ensuite été nommées VTL pour Vacuolar Iron Transporter1-Like. Ainsi, chez *Arabidopsis*, les 6 membres de la famille sont AtVIT1 (At2g01770), AtVTL1 (At1g21140, antérieurement nommé CCC1-like1), AtVTL2 (At1g76800, précédemment CCC1-like2), AtVTL5 (At3g25190, auparavant CCC1-like3), et AtVTL3 (At3g43630 ou nodulin-like3 ou CCC1-like4) et AtVTL4 (At3g4660 ou CCC1-like5) (Figure 16). L'activité de transport de fer d'AtVTL1, AtVTL2 et AtVTL5 a été testé par expression dans la souche mutante $\Delta ccc1$. Seul AtVTL1 est capable de compléter l'hypersensibilité à l'excès de fer de la souche $\Delta ccc1$ (Gollhofer *et al.*, 2014).

Des protéines homologues à ScCCC1 et AtVIT1 sont présentes dans le génome de nombreuses espèces végétales. Ainsi, les deux homologues chez le riz, OsVIT1, OsVIT2, un homologue chez la tulipe, TgVIT1, et un homologue chez le bleuet, CcVIT1, sont capables de compléter le défaut de croissance de la souche $\Delta ccc1$ en conditions d'excès de fer (Zhang *et al.*, 2012, Momonoi *et al.*, 2009, Yoshida and Negishi, 2013).

spécifiques de la graine, les grains polis atteignent des concentrations en fer jusqu'à sept fois supérieures (Masuda *et al.*, 2013, Masuda *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2012).

Ces résultats ont été obtenus chez le riz, l'une des plantes cultivées choisies pour cette stratégie car son contenu en fer est souvent limitant pour la nutrition humaine. D'autres équipes de recherche mettent en œuvre des approches similaires chez le blé ou encore le maïs (Borrill *et al.*, 2014, Lung'aho *et al.*, 2011).

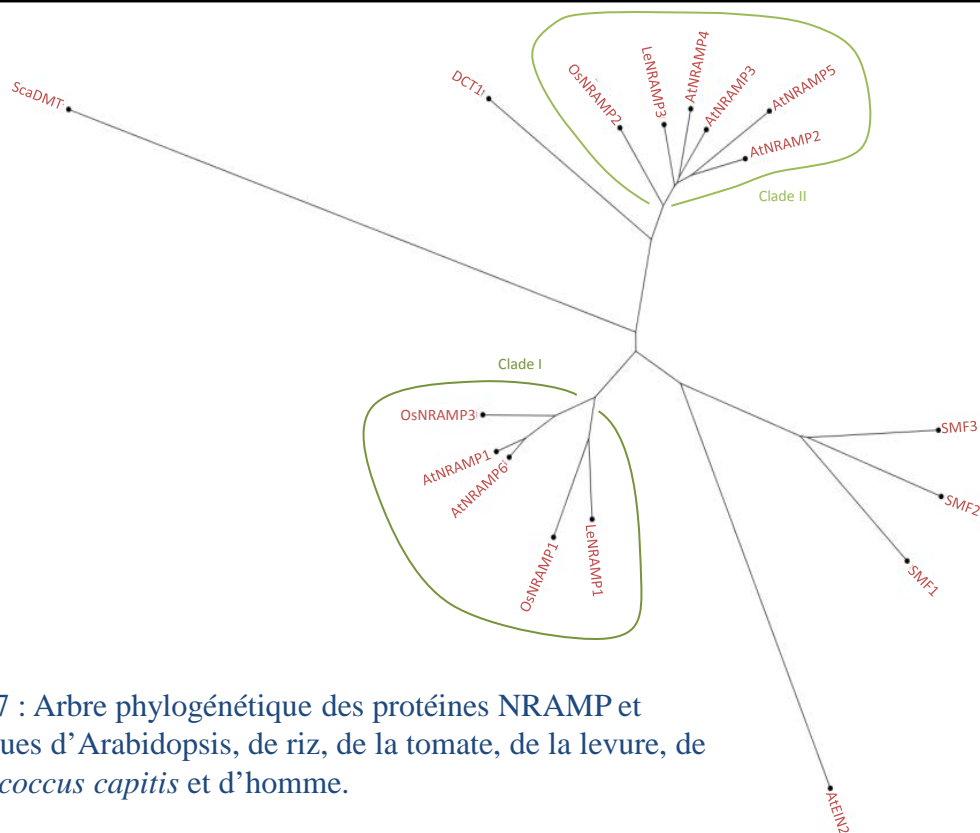


Figure 17 : Arbre phylogénétique des protéines NRAMP et homologues d'*Arabidopsis*, de riz, de la tomate, de la levure, de *Staphylococcus capitis* et d'homme.

Protéines de la famille NRAMP

La famille NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) regroupe des protéines membranaires (généralement 10 à 12 domaines transmembranaires prédits) conservées au cours de l'évolution. Nous nous concentrons sur les NRAMP présents dans le règne végétal et plus spécifiquement chez *Arabidopsis thaliana*. D'abord identifiées chez le riz (Belouchi *et al.*, 1995), des séquences codantes pour des NRAMP ont ensuite été découvertes chez toutes les espèces végétales. Comme cela est le cas chez les homologues chez la levure où SMF1 et SMF2 jouent des rôles centraux dans le transport du manganèse et chez les mammifères où DMT1 joue un rôle essentiel dans le transport et le recyclage du fer, les homologues végétaux des NRAMP sont impliqués dans le transport des métaux. Récemment, la détermination de la structure de la protéine DMT de *Staphylococcus capitis* par cristallographie a permis l'identification des acides aminés responsables de la coordination des ions métalliques dans les protéines NRAMP (Ehrnstorfer *et al.*, 2014). Chez *Arabidopsis*, six membres ont été identifiés, auxquels s'ajoute EIN2 (Ethylene Insensitive 2) dont seule la partie N terminale possède une homologie avec les NRAMP. Les NRAMP végétaux forment deux groupes phylogénétiques : le clade I contenant AtNRAMP1 et AtNRAMP6 et le clade II qui comprend AtNRAMP2, AtNRAMP3, AtNRAMP4 et AtNRAMP5. Leur capacité à transporter le Mn, le Fe, le Zn et le Cd a été démontrée par les études en levure et *in planta* (Curie *et al.*, 2000, Thomine *et al.*, 2000, Thomine *et al.*, 2003, Lanquar *et al.*, 2004, Cailliatte *et al.*, 2009, Cailliatte *et al.*, 2010). AtNRAMP1 est localisé à la membrane plasmique et est exprimé principalement dans la racine. Il permet l'absorption du Mn par la racine lorsque ce métal est présent à faible concentration (Curie *et al.*, 2000, Cailliatte *et al.*, 2010). AtNRAMP2 est capable de transporter le Mn à partir de compartiments intracellulaires restant à identifier (Cailliatte, 2008). AtNRAMP3 et AtNRAMP4 fonctionnent de manière redondante sur le tonoplaste et permettent l'efflux de métaux divalents vers le cytoplasme (Thomine *et al.*, 2003, Lanquar *et al.*, 2005, Lanquar *et al.*, 2010, Molins *et al.*, 2013). AtNRAMP1, 3 et 4 font partie des gènes induits lors d'une carence en fer. AtNRAMP5 est spécifiquement exprimé dans le pollen. AtNRAMP6 est exprimé dans les tissus conducteurs mais également, selon les données de transcriptomique, dans les cellules de garde (Obulareddy *et al.*, 2013) et est localisé dans des compartiments intracellulaires encore non identifiés (Cailliatte *et al.*, 2009).

Objectifs de la thèse

Malgré les progrès réalisés ces 20 dernières années, de nombreuses questions concernant l'homéostasie du fer dans la plante restent en suspens et de nombreux acteurs moléculaires restent à découvrir.

Parmi celles-ci, certaines concernent la mise en place des réserves dans la graine, un processus crucial pour la biofortification : comment le fer est-il transféré de la plante mère à l'embryon ? Une fois le fer dans l'embryon, quels sont les mécanismes de transport qui permettent sa circulation et sa concentration dans certaines cellules en amont de VIT1 ? Est-ce que le stockage dans les vacuoles confère un avantage et en particulier dans celles des cellules entourant les faisceaux conducteurs ? Par quels mécanismes les fonctions de transport de la plante mère sont coordonnées à la demande de l'embryon en développement ?

Ainsi, l'objectif de cette thèse est la mise en évidence de gènes impliqués dans le stockage et la biodisponibilité du fer dans la graine chez *Arabidopsis*.

Afin de mieux comprendre les mécanismes complexes régissant le chargement et la remobilisation du fer dans les graines, ce travail de thèse a utilisé une stratégie de recherche de mutations supprimeurs des phénotypes du double mutant *nramp3nramp4* à l'aide d'une population mutagénisée à l'EMS. L'arrêt développemental précoce et la chlorose extrême affectant le mutant *nramp3nramp4* lorsqu'il germe sur milieu pauvre permet la sélection efficace de supprimeurs dans de grandes populations. AtNRAMP3 et AtNRAMP4 sont essentiels à la mobilisation du fer vacuolaire lors du développement de la plantule d'*Arabidopsis*. Il paraissait donc raisonnable d'espérer que certaines des mutations sélectionnées affecteraient le stockage du fer dans la vacuole et favoriseraient son accumulation dans un autre organe ou dans d'autres tissus de la graine.

Néanmoins, nous étions conscients que le contournement du stockage vacuolaire n'était pas le seul mécanisme de suppression possible. Par exemple, on peut s'attendre à identifier aussi des mutations restaurant la sortie du fer vacuolaire soit en modifiant la sélectivité d'un transporteur de la membrane vacuolaire pour la rendre perméable au fer, soit en modifiant la localisation d'un transporteur de fer d'une autre membrane pour l'adresser à la membrane vacuolaire.

Une approche génétique sans *a priori* peut aussi révéler des mécanismes de suppression originaux que nous n'avons pas imaginés et apporter un nouveau point de vue sur la mise en place et l'utilisation des réserves de fer de la graine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1. Souches de levures

1.1.a. Génotypes

Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* sauvage DY150 (*MATa*; *ura3-53*, *leu2-3,112*, *trp1-1*, *his3-11*, *ade2-1*, *can1-100(oc)*) et mutante $\Delta ccc1$ (*MATa*; *ura3*, *leu2*, *trp1*, *his3*, *ade2*, *can1*, $\Delta ccc1::HIS3$) ont été utilisées pour le test de complémentation par AtVIT1 et sa version mutante (Li *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2006).

1.1.b. Milieux et conditions de cultures

Les levures sont cultivées sur milieu SD (Synthetic Defined medium, YNB 0,67 % (Sigma, Saint-Louis, MO), glucose 2% [m/v], MES 50 mM, adénine 20 mg/L, arginine 20 mg/L, histidine 20 mg/L, isoleucine 30 mg/L, leucine 100 mg/L, lysine 30 mg/L, méthionine 20 mg/L, phénylalanine 50 mg/L, thréonine 200 mg/L, tryptophane 20 mg/L, tyrosine 30 mg/L, uracile 20 mg/L et valine 150 mg/L ; et bacto-agar 2% (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ) pour un milieu solide). Un milieu SD dépourvu d'histidine et d'uracile est utilisé pour la sélection des souches $\Delta ccc1$ présentant le vecteur. Pour le test de complémentation en goutte des différentes versions du transporteur AtVIT1, le milieu SD dépourvu en uracile est complémenté ou non avec du FeSO_4 aux concentrations indiquées. La concentration en adénine dans le milieu peut être augmentée afin d'éviter la coloration rouge des levures (200 mg/L ont été utilisé dans notre cas).

Les levures sont cultivées à 30°C (agitation à 130 rpm pour les milieux liquides). La densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 600 nm. Une $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$ correspond à environ $2 \cdot 10^7$ levures par mL.

1.2. Matériel végétal

1.2.a. Génotypes étudiés

Les mutants *nramp3nramp4* et *vit1-1* ont été décrits précédemment (Ravet *et al.*, 2009; Molins *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2006). Le triple mutant *nramp3nramp4vit1-1* a été obtenu par

croisement du double mutant *nramp3nramp4* avec le simple mutant *vit1-1*. La descendance F2 a été analysée par PCR et les plantes homozygotes mutantes aux 3 loci ont été sélectionnées.

1.2.b. Culture *in vitro*

Les graines préalablement stérilisées en surface soit à l'eau de javel soit au Cl_2 sont semées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire sur milieu solide ABIS.

Le milieu ABIS solide est composé de 2,5 mM H_3PO_4 , 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, du mélange Murashige and Skoog de microéléments, 1% sucrose, 1% Phytigel (pour le suivi de croissance racinaire) ou 0.7% Phytoagar (pour toutes les autres expériences), 1 mM MES, ajusté à pH 6.1 à l'aide de KOH. Le fer est ajouté à une concentration de 50 μM sous la forme de $\text{Fe}^{3+}\text{HBED}$. La solution mère de $\text{Fe}^{3+}\text{HBED}$ (10 mM) est préparée en mélangeant du FeCl_3 et du HBED [N,N'-di(2-hydroxybenzyl)ethylene diamine-N,N'- diacetic acid monochloride hydrate (Strem Chemicals, Newburyport, MA)] mole à mole mais avec un excès de HBED de 5%, de telle sorte que tous les ions Fe^{3+} soient chélatés par le HBED. Pour un milieu dépourvu en fer, soit le Fe est simplement omis (milieu appelé « - Fe »), soit il est omis et un chélateur est ajouté : la ferrozine (milieu nommé « - Fe + 50 μM Fz »). La ferrozine (ou [3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine]) chélate le Fe(II) avec une très forte affinité et empêche son absorption.

Les graines sont ensuite stratifiées durant 2 jours à 4°C à l'obscurité. Les boîtes sont enfin placées soit à la verticale (lors du suivi de croissance racinaire) soit à l'horizontale (pour l'ensemble des autres expériences) dans des chambres de culture climatiques (Sanyo MLR-350, Morigushi, Japan) à 21°C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à une intensité de 120 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

1.2.c. Production de plantes entières, siliques, graines en espace S2

Les plantules préalablement cultivées *in vitro* peuvent être repiquées pour poursuivre leur croissance sur des pastilles Jiffy préalablement imbibées avec de l'eau. Les plantules sont maintenues sous une cloche translucide (ou mini-serre) pendant les premiers jours afin de conserver une hygrométrie élevée et de limiter le stress du transfert, puis les cloches sont progressivement ouvertes puis complètement retirées. L'arrosage a lieu tous les 2-3 jours avec de l'eau de ville. Les conditions climatiques dans les logettes de type S2 sont les suivantes : 21°C, 55% d'hygrométrie, 113 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et des

photopériodes de 8 h de lumière suivi de 16h d'obscurité pour les jours courts ou de 16h de lumière et 8 h d'obscurité pour les jours longs.

2. Méthodes

2.1. Coloration histologique du fer au Perls/DAB

Pour déterminer la localisation du fer dans des embryons matures et dans les jeunes plantules en cours de germination, une coloration au Perls/DAB est réalisée selon le protocole décrit par Roschztardt *et al.* (2009). Les embryons matures sont obtenus par dissection des graines imbibées dans de l'eau et stockées à 4°C à l'obscurité pendant une nuit. Pour l'expérience de suivi de la mobilisation du fer au cours de la germination, les plantules utilisées ont été semées sur milieu ABIS - Fe + 50 µM ferrozine.

2.2. Analyse des contenus en métaux

Trois à quatre réplicats d'environ 20 mg de graines sèches sont digérés dans 2 mL d'acide nitrique 70% sur un bloc chauffant DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) suivant la séquence de températures : 1 h à 80°C, puis 1 h à 100°C, et 2 h à 120°C. Lorsque la digestion est terminée, 10 mL d'eau ultrapure sont ajoutés afin d'atteindre un volume de 12 mL. Les contenus en calcium (Ca), fer (Fe), magnésium (Mg), manganèse (Mn) et zinc (Zn) sont déterminés par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) à l'aide du spectromètre de flamme AA240FS (Agilent, USA).

2.3. Techniques de biologie moléculaire

2.3.1. Extraction d'ADN génomique

2.3.1.a. Extraction rapide d'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait par une méthode ultra-rapide décrite par Edwards *et al.*, 1991. Environ 30 mg de très jeunes feuilles ou des jeunes plantules cultivées *in vitro* sont prélevés dans un tube eppendorf, congelés rapidement dans l'azote liquide et broyés soit au vibrobroyeur (Retsch MM301), soit au pilon en plastique adapté.

Après ajout d'un volume de tampon d'extraction (Tris HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%) adapté en fonction de la quantité d'échantillon (15 µL/mg, maximum 400 µL), les tubes sont vortexés durant au moins 1 min puis centrifugés pendant 5 min à 18 000 g. On récupère le surnageant (au maximum, 350 µL) auquel est ajouté de

l'isopropanol (ratio volumique de 1 :1). Après précipitation de l'ADN (5 min à température ambiante), on réalise une nouvelle centrifugation de 5 min à 18 000 g. Le surnageant est retiré alors que le culot est conservé, légèrement séché puis lavé par 1 mL d'éthanol 70% avant une dernière centrifugation de 5 min à 18 000 g à l'issue de laquelle le surnageant est éliminé. Le culot d'ADN précipité est séché 10 min à 65°C. Le culot est finalement resuspendu dans 100 µL d'eau ultrapure. Les échantillons peuvent être conservés à 4°C ou à -20°C.

2.3.1.b. Extraction d'ADN par kit Qiagen® « DNAeasy Plant Minikit »

Afin de réaliser des amplifications suivies d'un séquençage du gène *VIT1*, l'ADN est préparé à l'aide du kit « DNAeasy Plant Minikit » (Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur.

2.3.1.c. Extraction d'ADN pour séquençage haut-débit

Cinq grammes de tissu congelé à l'azote liquide sont réduits en poudre par broyage au mortier. Cette poudre est mélangée à 20 mL de tampon d'extraction (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8 100 mM et β-mercaptoéthanol 0.2%) puis le mélange est incubé durant 30 min à 60°C environ toutes les 5 minutes. Après incubation, 20 mL de chloroforme:isoamylalcool (24 :1) sont ajoutés, puis le tube est vortexé et centrifugé durant 10 min à 4000 rpm à 4°C. Aux 15 mL de phase aqueuse récupérés sont ajoutés 15 mL de chloroforme:isoamylalcool (24 :1). Ce nouveau mélange est également vortexé puis centrifugé durant 10 min à 4000 rpm à 4°C. La phase aqueuse dorénavant propre est transférée dans un tube en verre et 12 mL d'isopropanol sont ajoutés. L'ensemble est doucement mélangé puis centrifugé durant 10 min à 10 000 rpm à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec 10 mL d'éthanol 70%. Après une dernière centrifugation de 10 min à 4000 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot séché sous hotte.

Le culot est ensuite resuspendu dans 500 µL de Tris-HCl pH 7.5 10 mM. Pour améliorer la pureté de l'échantillon, 100 µL de cette préparation d'ADN sont traités comme un échantillon de plante avec le kit « DNAeasy Plant Minikit » (Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. L'élution finale est réalisée avec le tampon AE du kit.

Les échantillons sont ensuite concentrés au speed vac afin d'atteindre des concentrations supérieures à 350 ng/µL, requises pour la préparation de la banque de fragments d'ADN au vue du séquençage.

Amorces utilisées pour le génotypage des allèles mutants <i>nramp3</i> et <i>nramp4</i>	
NRAMP3_fw1	5'-TGTCCCAGAAAAACAAACAAAAC-3'
NRAMP3_rev1	5'-TCCTGATTCCAACAAAAAGACC-3'
LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
Lba1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'
NRAMP4_fw1	5'-AGTCGTCACCTTTAGTCGCAGC-3'
NRAMP4_rev1	5'-TAAAACGACTTGGCAAACACC-3'
NRAMP4_rev5	5'-ACATCCCACAATACCAACA-3'
Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de <i>VIT1</i>	
VIT1_for2	5'-ACCACAAGACATGCAACAAAC-3'
VIT1_rev1	5'-TTCCCACACACACACTTCACAA-3'
VIT1_for3	5'-GAATCTCTGCCACTTCAG-3'
VIT1_rev3	5'-CCTGAAACTGGTAAGACC-3'
Amorces utilisées pour l'amplification après RT des ADNc <i>VIT1</i>	
VIT1qPCRex1	5'-CGGAGAAATC GTACGTGACA-3'
VIT1qPCRex4	5'-GTAACGGTATAAAACC GCCAAG-3'
Actin2_fwq	5'-GGTAACATTG TGCTCAGTGGTGG-3'
Actin2_revq	5'-AGCATGAAGATTAAGGTCGTT-3'
VIT1qPCRex2	5'-TCTCCCTCGCGTAATGATCT-3'
Amorces mutagènes pour générer <i>VIT1</i> ^{G77D}	
VIT1yeast_3-4-for	5'-CCCATGGAGATAGCATCGGCCGCGACTTCGG-3'
VIT1yeast_3-4-rev	5'-CCGAAGTCGCGGCCGATGCTATCTCCATGGG-3'

Tableau 1 : Récapitulatif des amorces utilisées pour les différentes amplifications.

2.3.2. Génotypage

Les conditions de mélange PCR sont les mêmes pour toutes les amplifications d'ADN génomique : 2 µL d'ADN génomique sont ajoutés au mélange PCR contenant 1 µM de chaque amorce, 2 µL de dNTP (2 mM chacun), 2 µL de tampon 10X contenant du MgCl₂, 0,5 unité de Dream Taq polymérase (Fermentas®, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) et de l'eau ultrapure q.s.p. 20 µL.

L'ensemble des amorces utilisées sont récapitulées dans le tableau 1.

2.3.2.a. PCR de génotypage des allèles mutants par insertion d'ADN-T dans *NRAMP3* et *NRAMP4*

Les amorces *NRAMP3_fw1* et *NRAMP3_rev1* sont employées pour amplifier l'allèle sauvage de *NRAMP3* (voir Tableau 1). Les couples d'amorces *NRAMP3_fw1* et *LBb1* ainsi que *NRAMP3_fw1* et *LBa1* sont utilisés simultanément pour amplifier l'allèle mutant *nramp3*. Concernant l'amplification de l'allèle sauvage *NRAMP4*, nous utilisons le couple d'amorces : *NRAMP4_fw1* et *NRAMP4_rev1*. Pour l'amplification de l'allèle mutant *nramp4*, les couples amorces suivantes sont utilisés conjointement : *NRAMP4_rev1* et *Lba1* ainsi que *NRAMP4_rev5* et *LBb1*.

Les amplifications de ces différents allèles sont réalisées grâce au programme PCR suivant : dénaturation initiale 5 min à 94°C, 35 cycles comportant une dénaturation (30 sec à 94°C), une hybridation (30 sec à 65°C) et une extension (1 min 30 sec à 72°C), extension finale 5 min à 72°C.

2.3.2.b. Amplification, purification sur gel et séquençage du gène *VIT1*

Les amorces *VIT1_for2* et *VIT1_rev1* ont été utilisées pour amplifier la séquence codante du gène *VIT1*. Après PCR, les amplicons sont séparés sur gel d'agarose 1.5%. Les bandes obtenues sont découpées sur gel, purifiées à l'aide du kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Qiagen®, Hilden, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur et séquencées par l'entreprise GATC (Köln, Germany) à l'aide des amorces *VIT1_for2*, *VIT1_for3*, *VIT1_rev1* et *VIT1_rev3*. Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel CLC Main Workbench (Toolbox / Sequencing Data Analysis / Assemble Sequences to Reference).

2.3.3. Extraction d'ARN totaux de siliques

Les ARN sont extraits à l'aide du kit PowerPlant[®] RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) à partir de 12-15 siliques vertes et en suivant les instructions du fabricant. Le traitement à la DNase RNase-free (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) est réalisé en appliquant un volume de 5 µL à une concentration de 5 U/µL directement sur les colonnes (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA). Les ARN sont élués à l'aide de 100 µL d'eau RNase-free.

2.3.4. RT-PCR et vérification par séquençage des amplicons

Un microgramme d'ARN est utilisé pour réaliser la retro-transcription à l'aide du kit SuperScript III First-Strand Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) en utilisant comme amorce des hexamères aléatoires.

Les amorces VIT1qPCREx1 et VIT1qPCREx4 sont utilisées pour amplifier les ARN messagers de *VIT1*. Les amorces Actin2_fwq et Actin2_revq sont utilisées pour amplifier l'*ACTINE2* utilisée ici comme contrôle (voir le Tableau 1).

La PCR est réalisée suivant le protocole : dénaturation initiale (5 min à 94°C), amplification 35 cycles (pour *VIT1*) ou 25 cycles (pour *ACTINE2*) comprenant dénaturation (30 sec à 94°C), hybridation (30 sec à 60°C) et extension (30 sec à 72°C) puis extension finale de 5 min à 72°C.

Les amplicons sont séparés sur gel d'agarose 1.5% dans un tampon TAE (Tris Acetate EDTA) modifié où la concentration en EDTA est abaissée à 0.1 mM. Les bandes obtenues sont découpées sur gel et purifiées à l'aide du kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Qiagen®, Hilden, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur puis séquencées par l'entreprise GATC à l'aide des amorces VIT1qPCREx1, VIT1qPCREx2 et VIT1qPCREx4. Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel CLC Main Workbench (Toolbox / Sequencing Data Analysis / Assemble Sequences to Reference).

2.3.5. Mutagenèse

Les vecteurs d'expression en levure ont été décrits par Kim *et al.*, 2006. La version mutée de VIT1 (appelée VIT1^{G77D}) a été générée grâce au kit QuikChange[®] II KL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene®, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) à l'aide des amorces mutagènes VIT1yeast_3-4-for et VIT1yeast_3-4_rev (voir Tableau 1).

2.3.6. Expression en levures

Les cellules de la souche mutante $\Delta ccc1$ ont été transformées soit avec le vecteur vide m3838, comme contrôle négatif, soit avec des vecteurs contenant l'ADNc codant AtVIT1 ou sa version mutée AtVIT1^{G77D} fusionnées ou non à la GFP sous le contrôle du promoteur *MET25* par la méthode d'acétate de lithium (Kim *et al.*, 2006, Gietz *et al.*, 1992). Les cellules $\Delta ccc1$ transformées sont sélectionnées sur milieu SD -Ura -His. La complémentation de $\Delta ccc1$ est testée par dépôt en goutte de dilutions en série de chaque souche de levures sur milieu SD -Ura auquel est ajouté ou non 5 mM ou 10 mM de FeSO₄. Les boîtes sont ensuite placées à 30°C durant 2 jours.

2.4. Techniques de biochimie

2.4.1. Extraction des pigments et analyses

Après broyage des feuilles dans l'azote liquide, les pigments sont extraits dans 1 mL d'éthanol à température ambiante durant 30 min. Après 10 min de centrifugation à température ambiante à 19 000 g, le surnageant est récupéré et stocké pendant une nuit à -20°C. Après 5 min de centrifugation à température ambiante à 19 000 g, les absorbances mesurées à 470, 534, 643, 661 et 750 nm par spectrophotométrie permettent de calculer les concentrations en chlorophylle a et b, en anthocyanes et en caroténoïdes dans l'échantillon (Porra, Thompson & Kriedemann, 1989).

2.4.2. Extraction de protéines de levures

Les levures sont mises en culture pendant une nuit à 30°C dans 10 mL de milieu minimum sélectif SD (pour la composition, voir précédemment). Après centrifugation de la culture (1 800 g, 2 min, 4°C), le culot est placé dans l'azote liquide puis repris dans 80 µL de tampon d'extraction (Urée 8 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, β-mercaptoéthanol 5% [v/v]) et incubé pendant 5 min à 65°C. Un volume égal de billes en verre de diamètre 425-600 µm (Glass beads, acid-washed, SIGMA) est ajouté. Le tout est alternativement mélangé au vortex pendant 30 sec et chauffé à 65°C pendant 5 min, deux fois de suite. Après centrifugation (5 min à 10 000 g), les protéines du surnageant sont dosées par méthode de Bradford ou coloration « Amidoblack » avant d'être reprises dans le tampon de Laemmli [1X : SDS 2,5% (m/v), Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glycérol 10% (m/v), bleu de bromophénol 0.004% (m/v), DTT 130 mM].

2.4.3. Dosage des protéines par coloration « Amidoblack »

Les protéines extraites sont mélangées avec de l'eau jusqu'à atteindre un volume de 200 µL. Après une étape de vortex et de centrifugation rapide, 800 µL de colorant « Amidoblack » (Amidoblack 0,25% (v/w), méthanol 45%, acide acétique 10%) sont ajoutés. Le mélange est vortexé au moins 10 secondes puis centrifugé à vitesse maximale à 10°C durant 15 min. Le surnageant est retiré délicatement à la pipette pasteur ou à l'aide d'une pompe à vide. Les protéines sont alors généralement visibles sous la forme de précipités bleu foncés. L'échantillon est lavé avec 1 mL de solution de lavage (méthanol 45% et acide acétique 10%). L'échantillon est de nouveau vortexé, centrifugé comme précédemment et le surnageant éliminé avec précaution. Cette étape de lavage est répétée une seconde fois. Le culot est dissous dans 1 mL de NaOH 0,2 M, vortexé et incubé durant 5 minutes à température ambiante. L'échantillon est une dernière fois vortexé et rapidement centrifugé avant mesure de l'absorbance à 615 nm. La concentration en protéine est déterminée selon la courbe standard fiable à partir de 20 µg/mL [équation de la courbe standard : concentration (µg/mL) = $Abs_{615nm}/0,028$].

2.4.4. Séparation des protéines par électrophorèse et Western blot

Les protéines reprises dans le tampon Laemmli sont dénaturées à 95°C pendant 5 min puis séparées sur gel d'acrylamide à 10% (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BIORAD). Pour chaque extrait, la même quantité de protéines est déposée sur gel. La migration est effectuée à 30 mA/gel dans une cuve contenant du tampon d'électrophorèse (Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0.1% [m/v]). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose du kit Trans-Blot Turbo Transfer Packs (BIORAD). Le transfert est réalisé dans une cassette (Trans Blot turbo-transfert System, BIORAD) pendant 3 min en utilisant le programme turbo. La membrane est saturée par une incubation pendant 1 h à 37°C dans du tampon TBS-T (Tris 10 mM, pH 7.5, NaCl 154 mM, Tween 0.1 à 0.3% [v/v]) en présence de lait écrémé 5% (w/v). La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps anti-VIT1 (dilution) dilué dans du TBS-T, lait 1%. Après 3 lavages de 5 min dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/10 000). Pour finir, 3 lavages sont effectués dans du TBS-T. L'activité peroxydase est révélée par la technique de chimioluminescence (ECL) suivant le protocole fourni par ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE

Maps Reads to Reference

Read alignment

no masking

masking option

mismatch cost 2

insertion cost 3

deletion cost 3

length fraction 0,95

similarity fraction 0,98

autodetected paired distance

global alignment

Non-specific match handling

map randomly

non specific match handling

Create stand alone read mapping

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions utilisées pour l'alignement de la séquence à la référence

Healthcare). Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le Precision Plus Standards, All Blue (BIORAD).

2.5. Analyse des données de séquençage haut-débit de Eurofins©

Les ADN extraits par la méthode décrite en 2.3.1.c. sont envoyés à la société Eurofins© pour la préparation des banques et leur séquençage haut-débit.

2.5.1 Matériel

Le séquençage est réalisé par technique Illumina-HiSeq, par un protocole shotgun et de « paired-end sequencing ». C'est-à-dire que le séquençage des fragments d'ADN génomique pris au hasard est réalisé à partir des deux extrémités : on obtient une séquence de chaque extrémité de chaque fragment et ces paires de séquences sont associées. Les fragments séquencés ont une taille approximative de 300 bp dont on séquence environ 100 bp à chaque extrémité de fragment. Les données finales produites sont entre 6295 Mbp et 7615 Mbp séquencés. Le génome d'*Arabidopsis* comportant environ 157 Mbp, la couverture moyenne obtenue dans nos expériences se situe entre 40 et 48,5 fois le génome.

Les données de séquençage sont analysées sur un ordinateur Dell Precision T1600 Intel® Xeon R CPU E31225 @ 3,10 GHz possédant une RAM 16,0 GB et un système fonctionnant en 64 bit. Les données sont traitées à l'aide du logiciel CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com/>).

2.5.2 Méthodes

Tout d'abord les fichiers sont décompressés. Le génome de référence avec annotations d'*Arabidopsis thaliana* TAIR10 est téléchargé depuis la base de données TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).

2.5.2.a. Alignement des séquences à une référence

Les paires de séquences correspondant à chaque fragment séquencé sont alignées sur la référence de Col0 (Toolbox/NGS Core Tools/Maps Reads to Reference). Les conditions sélectionnées sont indiquées dans le tableau 2. Le « mismatch cost » correspond au coût d'un mismatch/d'une erreur entre la lecture et la séquence de référence. L'« insertion cost » détermine le coût d'une insertion dans la lecture provoquant un trou dans la séquence de référence. Le « deletion cost » indique le coût d'avoir un trou dans la lecture. La « length

Quality-based Variant Detection

Quality based variant detection

neighborhood radius	5
max gap and mismatch count	0
mini neighborhood quality	30
mini central quality	35
significance threshold	
minimum coverage	5
minimum variant frequent	10 ou 0,5

Variant filters

require variant on forward and reverse	yes
ignore variants from unspecific regions	no
Filters for 454/Ion homopolymers indels	no

Genome information

ploidy/max allele	2
genetic code	standard

Tableau 3 : Récapitulatif des conditions utilisées pour la détection des SNP entre la séquence et la référence

fraction » détermine la longueur minimale en fraction qu'une lecture doit avoir en commun avec la séquence de référence. La « similarity fraction » détermine l'identité minimale en fraction entre la lecture et la séquence de référence. Le « stand alone read mapping » inclut la séquence de référence dont ses annotations, l'ensemble des lectures obtenues et la séquence consensus générée à partir de ses lectures (voir Figures 24 et 25).

2.5.2.b. Détection des SNP

Pour détecter les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) entre les différents assemblages de séquences et la référence, on utilise la « Quality-based Variant Detection » (Toolbox / Resequencing/Quality-based Variant Detection) fondée sur l'algorithme de « neighbourhood quality standard », utilisant une combinaison de filtres de qualité et de seuils spécifiques de l'utilisateur pour la couverture et la fréquence. Les conditions sélectionnées sont indiquées dans le tableau 3. Le « significance threshold minimum coverage » est précisé car si les variations sont situées dans des régions à faible couverture, il peut y avoir une plus grande quantité de faux positifs. La « minimum variant frequency » indique le nombre minimal de lectures devant comporter la variation à une position donnée. On précise également au logiciel que la variation doit être présente à la fois sur le brin sens et sur le brin anti-sens afin d'éviter les faux positifs. Enfin, le logiciel détermine l'impact de la variation en fonction des annotations du génome de référence.

2.5.2.c. Comparaison des SNP entre 3 séquences

Afin de détecter uniquement les SNP présents dans un seul des trois assemblages et non celles partagées par tous les assemblages, on utilise un outil mis au point pour comparer les séquences entre un enfant et ses deux parents afin de déterminer des différences entre l'enfant et ses parents. Il s'agit de la comparaison de variants/SNP par « Trio Analysis » (Toolbox/Resequencing/Compare Variants/Trio Analysis). Après analyse, on peut extraire les informations sur les variants/SNP, notamment le chromosome, la région chromosomique, le type de changement, sa fréquence, son hérédité.

2.6. Organisation du crible des supresseurs de *nramp3nramp4*

Une population M0 d'environ 25 000 graines du double mutant *nramp3nramp4* a été traitée avec l'agent mutagène l'éthane méthyl sulfonate (EMS). Ces graines mutagénisées, nommées M1, ont été séparées en 24 séries. Chaque série est dispatchée dans 24 pots et semées par pool de 50 graines par pot. L'ensemble des graines issues de l'autofécondation des

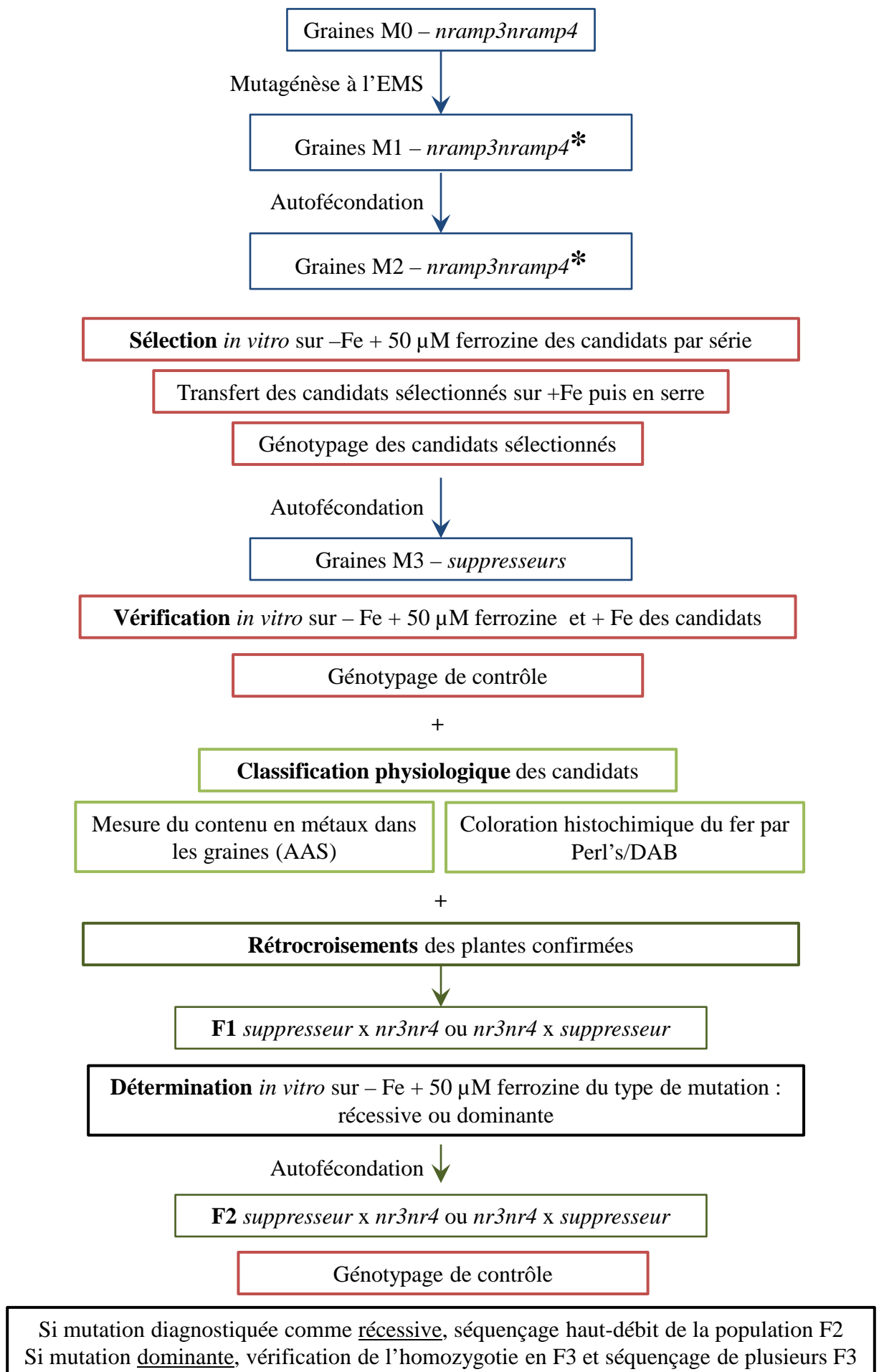


Figure 18 : Organigramme récapitulant les différentes étapes du crible et de la caractérisation des mutants.

plantes M1 est nommé M2. Cette population de graines M2 est ordonnée de 1-1 à 24-24, soit selon la descendance de chaque pot.

Pour chaque série correspondant à la descendance de 1200 graines M1 (soit une série de 24 pots contenant 50 graines M1 par pot), 19 200 graines M2 sont réparties sur 48 boîtes de Pétri et sont observées en parallèle des graines de *nramp3nramp4* et Col0. Ainsi, 800 graines de chaque M2 sont criblées, réparties sur 2 boîtes de Pétri (à une densité moyenne de 5 à 6 graines par cm²) contenant du milieu ABIS solide – Fe + 50 µM ferrozine. Comme la germination n'est pas homogène pour l'ensemble des mutants, certaines plantules M2 capables de se développer sur ce milieu sont « repérés » et sélectionnées après 3, 4 et 7 jours et transférées sur du milieu ABIS solide + Fe pendant 7 à 11 jours puis sur le sol et cultivées en serre. Des graines puis plantules Col0 et *nramp3nramp4* traitées de la même manière sont utilisées comme témoins. Afin d'éliminer les faux positifs ou graines sauvages ou contaminations, chaque plante M2 sélectionnée est génotypée par PCR afin de vérifier qu'elle contient les insertions d'ADN-T à l'état homozygote dans les deux gènes *NRAMP3* et *NRAMP4*.

L'autofécondation des plantes M2 produit une descendance nommée M3. Ce lot de graines est utilisé pour confirmer que le phénotype suppresseur est transmis à la descendance. Pour cela, 50 graines sont semées sur milieu ABIS solide correspondant aux conditions du crible (- Fe + 50 µM ferrozine). En parallèle, sont semées 50 graines sur boîtes de milieu ABIS solide + Fe, afin de vérifier que les phénotypes observés sont bien liés à la carence en fer. Les plantules capables de croître en conditions – Fe + 50 µM ferrozine sont transférées sur un milieu + Fe puis sur sol et cultivées en serre sur sol. Ces plantes, au stade floraison, sont utilisées afin de procéder à un premier rétrocroisement. Deux rétrocroisements réciproques sont réalisés si possible.

L'ensemble de ces étapes est résumé dans la figure 18.

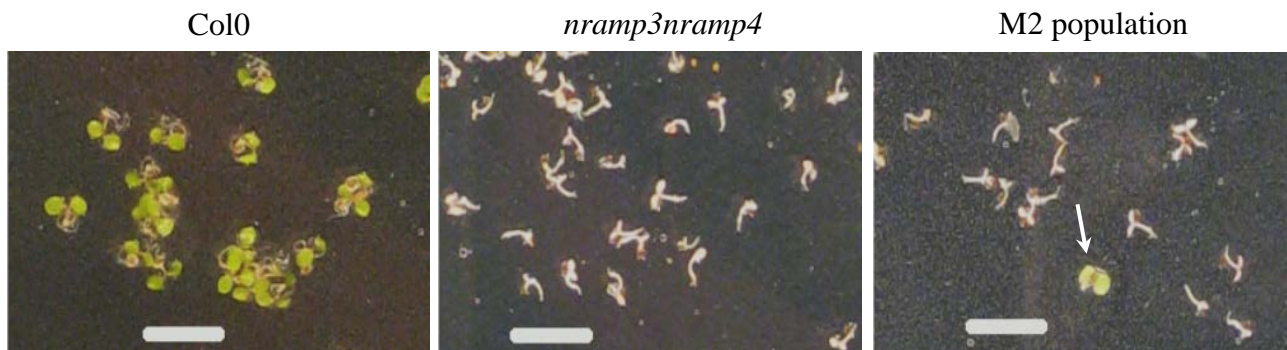


Figure 19 : Crible de la génération M2.

Plantules de 3 jours cultivées *in vitro* en conditions – Fe + 50 μ M ferrozine : Col0, *nramp3nramp4* et les plantules M2. La flèche blanche indique un exemple de plantule sélectionnée comme supresseur. Barre d'échelle : 0,5 cm

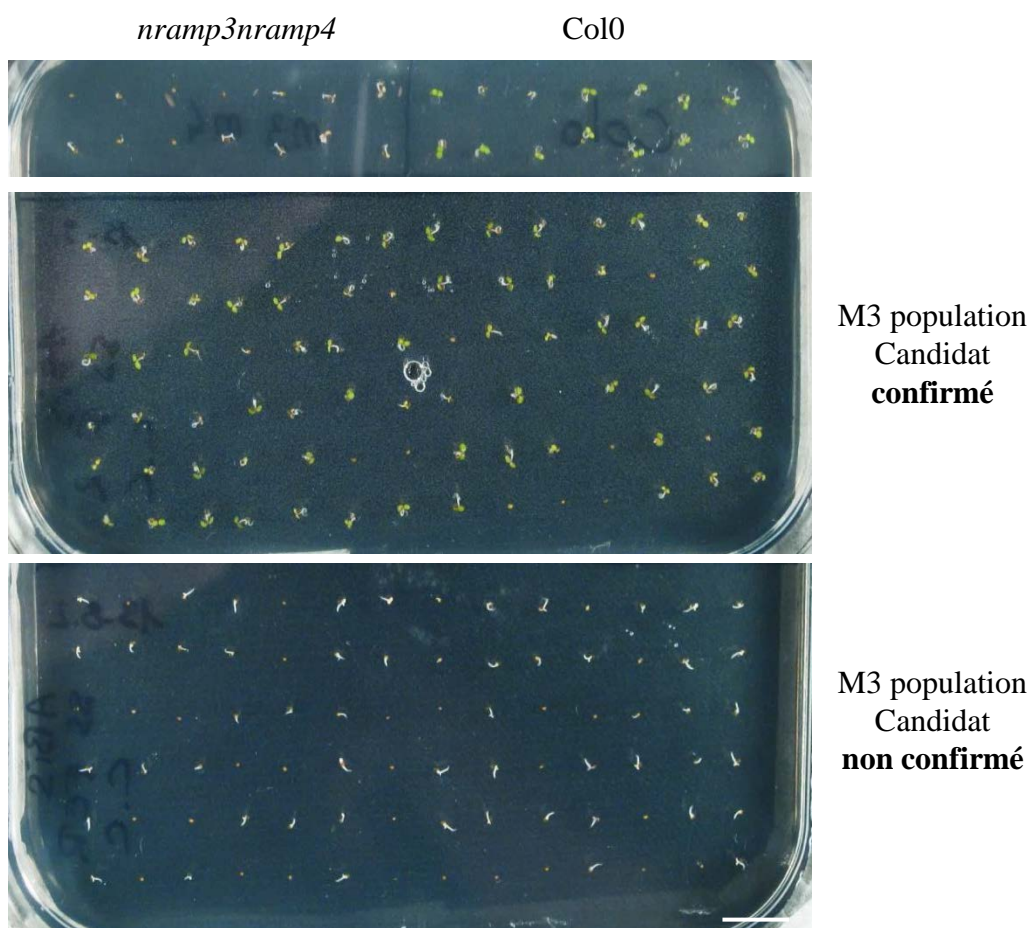


Figure 20 : Confirmation à la génération M3.

Plantules de 3 jours cultivées *in vitro* en conditions – Fe + 50 μ M ferrozine : Col0, *nramp3nramp4* et la descendance M3 des candidats M2 confirmé et non confirmé. Barre d'échelle : 1 cm

Chapitre 1 : LE CRIBLE

Principe du crible

Sur milieu dépourvu de fer, les plantules de *nramp3nramp4* sont fortement chlorotiques à 3, 4 et 7 jours après semis et leur croissance est arrêtée. Les critères utilisés pour la sélection des mutants supprimeurs sont la présence de chlorophylle dans leurs cotylédons et leur capacité à se développer sur le milieu de sélection (Figure 19). Nous avons nommé les mutants sélectionnés *isv* pour « bypass iron storage in vacuole ».

Résultats du crible primaire

Avant mon arrivée au laboratoire en 2011, le crible de la descendance de 14 400 plantes M1 (séries 1 à 12) avait permis de sélectionner 65 plantules M2 supprimeurs capables de se développer sur un milieu dépourvu de fer. Parmi ces candidats, 34 plantes avaient survécu au passage sur sol et avaient donné des graines. J'ai criblé les séries 13, 14 et 15, correspondant à 3 600 descendances de plantes M1. Ainsi, 58 candidats supprimeurs supplémentaires ont été sélectionnés dont 39 ont survécu au passage en serre et ont donné des graines.

En parallèle de la recherche de nouveaux candidats, les mutants déjà disponibles en M3 ont dû être confirmés.

Plusieurs méthodes de classification ont été utilisées pour trier les candidats :

- une classification génétique afin de déterminer le type de mutation, dominante ou récessive et, concernant les mutations récessives, les groupes de complémentation allélique.
- une classification par une approche physiologique en déterminant les contenus en métaux des lots de graines M3 ainsi que la localisation tissulaire du fer dans l'embryon mature par coloration Perls/DAB.

Confirmation du phénotype supprimeur et rétrocroisements

Suite au crible des séries 1 à 15, 73 candidats ont survécu au passage en serre et donné des graines. Sur ces 73 candidats, 66 ont été testés en génération M3 sur – Fe + 50 μ M

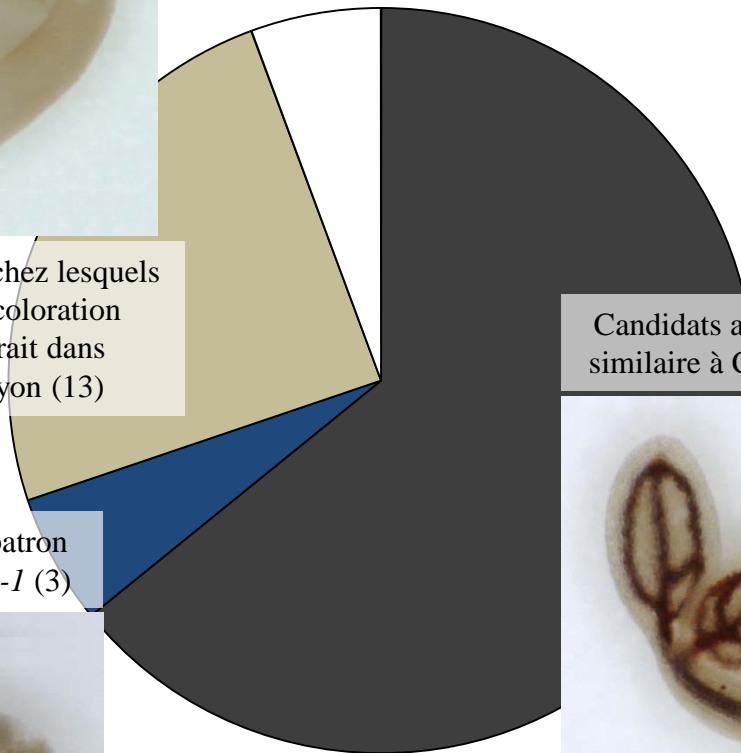
Col0

vit1-1



Candidats chez lesquels
aucune coloration
n'apparaît dans
l'embryon (13)

N.D.
(3)



Candidats au patron
similaire à Col0 (34)

Candidats au patron
similaire à *vit1-1* (3)



Figure 21 : Répartition des patrons de distribution du fer observés lors de la classification des candidats issus du crible. Les patrons de Col0 et de *vit1-1* sont présentés comme référence.

ferrozine afin de vérifier la transmission du caractère suppresseur. Ce crible secondaire a permis de confirmer 32 candidats (voir Annexe 1). Les deux cas - candidat confirmé et candidat éliminé - sont illustrés par la figure 20. Pour 26 de ces candidats nous avons initié des rétrocroisements. Les rétrocroisements permettent de déterminer si la mutation est récessive ou dominante et également d'éliminer du génome des mutations EMS qui ne sont pas associées au phénotype suppresseur.

Méthodes de classification sur des données physiologiques

Après la sélection des mutants suppresseurs pour leurs caractéristiques de croissance sur milieu dépourvu de fer, nous avons réalisé une classification de ces mutants selon les contenus en métaux de leurs graines et la distribution du fer au sein des embryons de la génération M3.

La détermination des contenus en métaux s'est résumée à une unique mesure sur environ 20 mg de graines. La totalité des candidats n'a pas pu être mesurée : pour certains, on ne disposait pas de suffisamment de graines, pour d'autres, les populations de graines étaient hétérogènes, par exemple, en raison d'un mélange de graines fertiles et de graines avortées. Les productions de graines ne s'étant pas déroulées au même moment en serre, des variations des apports nutritionnels de la plante mère étaient possibles rendant difficile les comparaisons entre les mesures. Enfin une unique mesure ne permettait pas de tester la validité statistique des différences observées. Cette approche n'a pas été généralisée.

Ainsi, nous avons préféré focaliser la classification physiologique sur la visualisation histochimique du fer par la coloration au Perls/DAB des embryons matures.

Les embryons du double mutant *nramp3nramp4* présentent la même distribution tissulaire du fer que les embryons de type sauvage Col0 : le fer est localisé dans les cellules entourant les tissus vasculaires. Nous utilisons également le mutant *vit1-1* comme « contrôle » pour ces expériences car il présente un patron de distribution perturbé. Nos résultats ont confirmé les observations de Kim *et al.* (2006) et de Roschzttardtz *et al.* (2009) indiquant une modification de distribution tissulaire du fer lorsque le gène *VIT1* est interrompu. Le fer est localisé dans les tissus sous-épidermiques de la radicule et dans la face abaxiale des cotylédons (Figures 12 et 21).

La classification par le Perls/DAB a parfois été réalisée en amont du test de germination sur - Fe + 50 μ M ferrozine des candidats. Ainsi nous disposons des distributions



Figure 22 : Patron de distribution du fer observé lors de la classification des candidats issus du crible. Chez certains candidats pour lesquels aucune coloration n'apparaît dans l'embryon, des traces de coloration Perls/DAB sont visibles dans les résidus d'albumen.

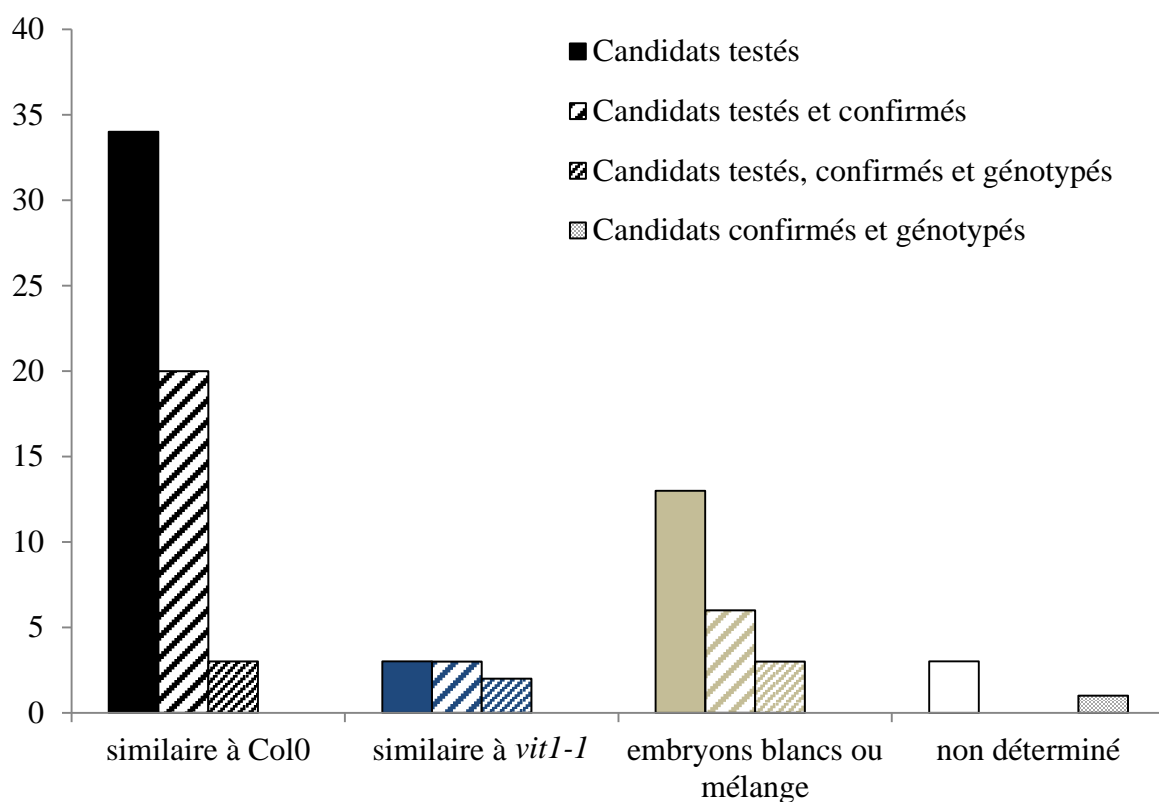


Figure 23 : Répartition des patrons de distribution du fer observés lors de la classification des candidats issus du crible. La première colonne indique le nombre total, la deuxième indique le nombre de candidats pour lesquels le phénotype suppresseur a été confirmé, la troisième colonne indique le nombre de candidats pour lesquels des F1 homozygotes *nramp3nramp4* ont été obtenues.

en fer dans les embryons matures de 50 candidats dont seulement 29 ont été confirmés comme supprimeurs. La majorité (34) présente une distribution en fer similaire au sauvage et au double mutant *nramp3nramp4* c'est-à-dire une coloration dans les cellules entourant les tissus vasculaires. Pour 3 candidats nommés *isv1*, *isv2* et *isv3*, le patron de distribution du fer est similaire à celui du mutant *vit1-1*. La caractérisation de ces mutants fait l'objet de la deuxième partie des résultats. Le troisième patron de distribution du fer observé correspond à une absence de coloration dans l'embryon mais parfois dans les restes d'albumen décrochés lors de la dissection. Chez 11 candidats, ces « embryons blancs » ne contenant pas de fer colorable par le Perls/DAB sont mélangés avec des embryons au patron sauvage. Seuls deux candidats ont une descendance constituée à 100% d'embryons blancs (Figures 21, 22 et 23).

Identification d'une mutation dominante par séquençage haut-débit

Pour débiter l'identification des gènes affectés par les mutations supprimeurs, nous avons choisi un candidat nommé *isv4* confirmé dont le phénotype de suppression fort avait été vérifié en M3. Le génotypage des allèles *nramp3* et *nramp4* des plantes sélectionnées en M3 avait montré qu'il ne s'agissait pas d'un faux positif. Nous avons produit après deux rétrocroisements successifs une population de cartographie en utilisant le double mutant *nramp3nramp4* existant dans le fond Ws (Wassilewskija). L'étude des ségrégations à l'issue du deuxième rétrocroisement indiquait qu'*isv4* était porteur d'une mutation dominante. Afin de déterminer le gène où se trouve la mutation responsable du phénotype supprimeur, nous avons envoyé à séquencer à la société Eurofins© trois échantillons d'ADN concentrés : celui du double mutant *nramp3nramp4* du fond Col0, d'un mélange de deux populations F2 composées chacun de 33 plantes au phénotype non supprimeur et d'un mélange de 9 plantes identifiées comme homozygotes supprimeurs en génération F3.

Le séquençage de *nramp3nramp4* (Col0) nous a permis de visualiser les insertions d'ADN-T. Les figures 24 et 25 montrent l'alignement des paires de lectures (ou reads) dans la région des gènes NRAMP3 et NRAMP4 chez le double mutant *nramp3nramp4*. On peut localiser la position de l'insertion de l'ADN-T par une petite interruption dans la couverture. Ce séquençage nous fournit également une séquence de référence avant mutagenèse, comportant des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) par rapport à la référence Col0 de TAIR.



Figure 24 : Alignement des paires de lecture séquencées de *nramp3nramp4* sur le génome de référence de Col0 dans la région du gène *AtNRAMP3* (symbolisé ici en bleu et orienté). L'interruption dans la couverture indique le site d'insertion de l'ADN-T (signalé dans la séquence consensus par une flèche rouge).

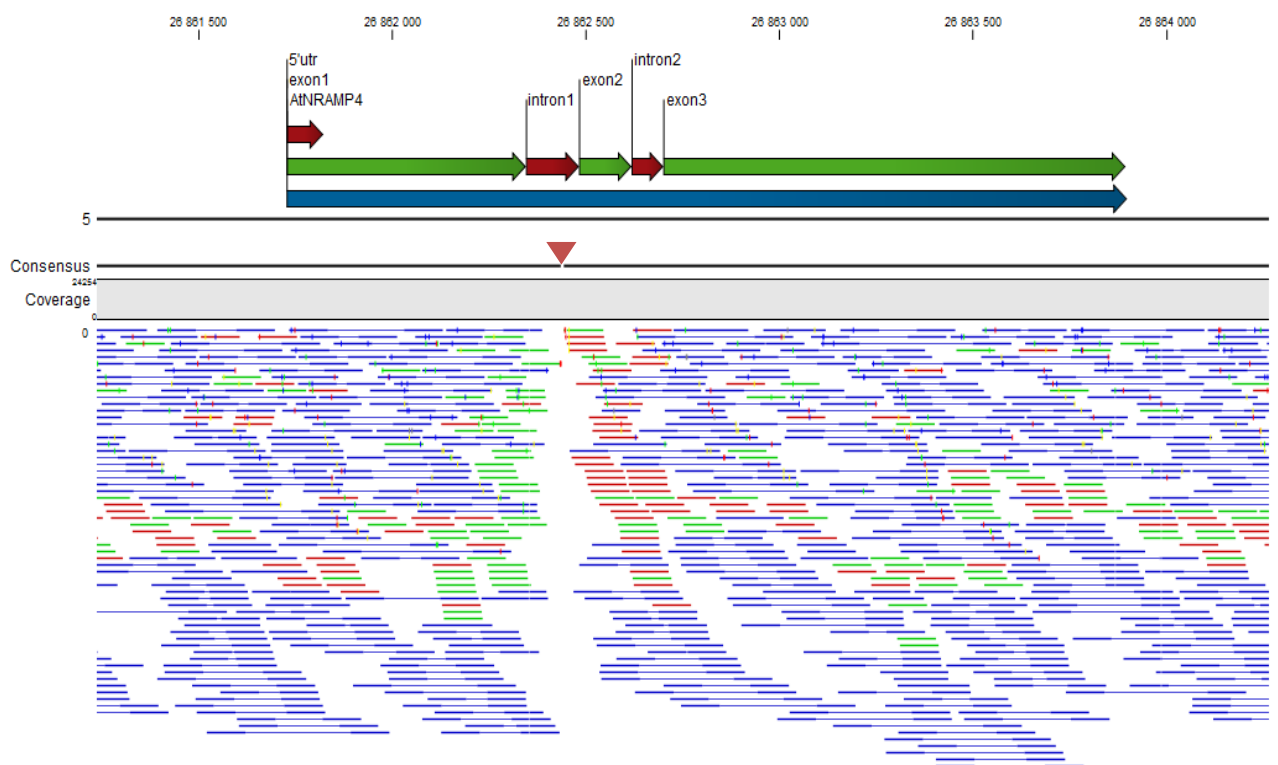


Figure 25 : Alignement des paires de lecture séquencées de *nramp3nramp4* sur le génome de référence de Col0 dans la région du gène *AtNRAMP4* (séquence codante symbolisée ici en bleu et orientée, structure en exon/intron également symbolisée avec les exons en vert et les introns en rouge en plus de la région 5'UTR). L'interruption dans la couverture indique le site d'insertion de l'ADN-T (signalé dans la séquence consensus par une flèche rouge).

Le séquençage des populations de F2 au phénotype non supprimeur nous permet la détection des SNP provenant de la mutagenèse mais également ceux de l'accèsion Ws. Ces SNP sont utilisables pour la cartographie d'une région enrichie en marqueurs Ws.

Le séquençage des populations de F3 homozygotes au phénotype supprimeur permet la recherche du SNP responsable du phénotype supprimeur et donc du gène porteur de cette mutation.

L'objectif était de déterminer les SNP existants dans les populations F2 et F3 par comparaison avec Col0 et *nramp3nramp4*. Le double mutant *nramp3nramp4* comporte des SNP par rapport au génome de référence Col0. Ces SNP devraient être également présents au sein des F2 et F3. Ensuite les SNP détectés à la fois au sein des F2 non supprimeurs et des F3 supprimeurs sont attribués à la mutagenèse mais ne sont pas responsables du phénotype supprimeur. Seuls les SNP présents uniquement au sein des F3 sont des mutations potentiellement responsables du phénotype (voir le schéma en Figure 26).

Afin de détecter uniquement les SNP présents dans un seul des trois assemblages et non ceux partagés par tous les assemblages, j'ai utilisé un outil employé dans le cas de l'étude d'un enfant et de ses deux parents afin de déterminer des différences en comparant l'enfant à ses parents. Il s'agit de la comparaison de variants/SNP par « Trio Analysis » du logiciel CLC Genomics Workbench. Nous avons défini comme fichier « enfant », les SNP détectés dans la population supprimeur F3 par rapport à Col0, comme fichier « mère », les SNP détectés au sein de *nramp3nramp4* en comparaison à Col0 et comme fichier « père », les SNP détectés par confrontation entre la population F2 et Col0. Cette analyse nous permet de déterminer des données telles que l'hérédité de la variation détectée : est-ce que ce SNP est uniquement présent dans les F3, ou « hérité » de la mère correspondant aux SNP pré-existants chez *nramp3nramp4*.

Les données obtenues suite à l'alignement des séquences à la référence Col0 et le nombre de variants par rapport à cette référence détectés par la méthode employée sont résumées dans le tableau 4.

Cette approche n'a pas permis de détecter un SNP responsable du phénotype supprimeur chez le candidat *isv4*. Par contre l'analyse de l'alignement dans la région du gène *AtNRAMP4* a montré que le gène était intact chez les F3 ayant le phénotype supprimeur. Ces F3 correspondent donc à des faux positifs et ne peuvent apporter d'information sur le gène

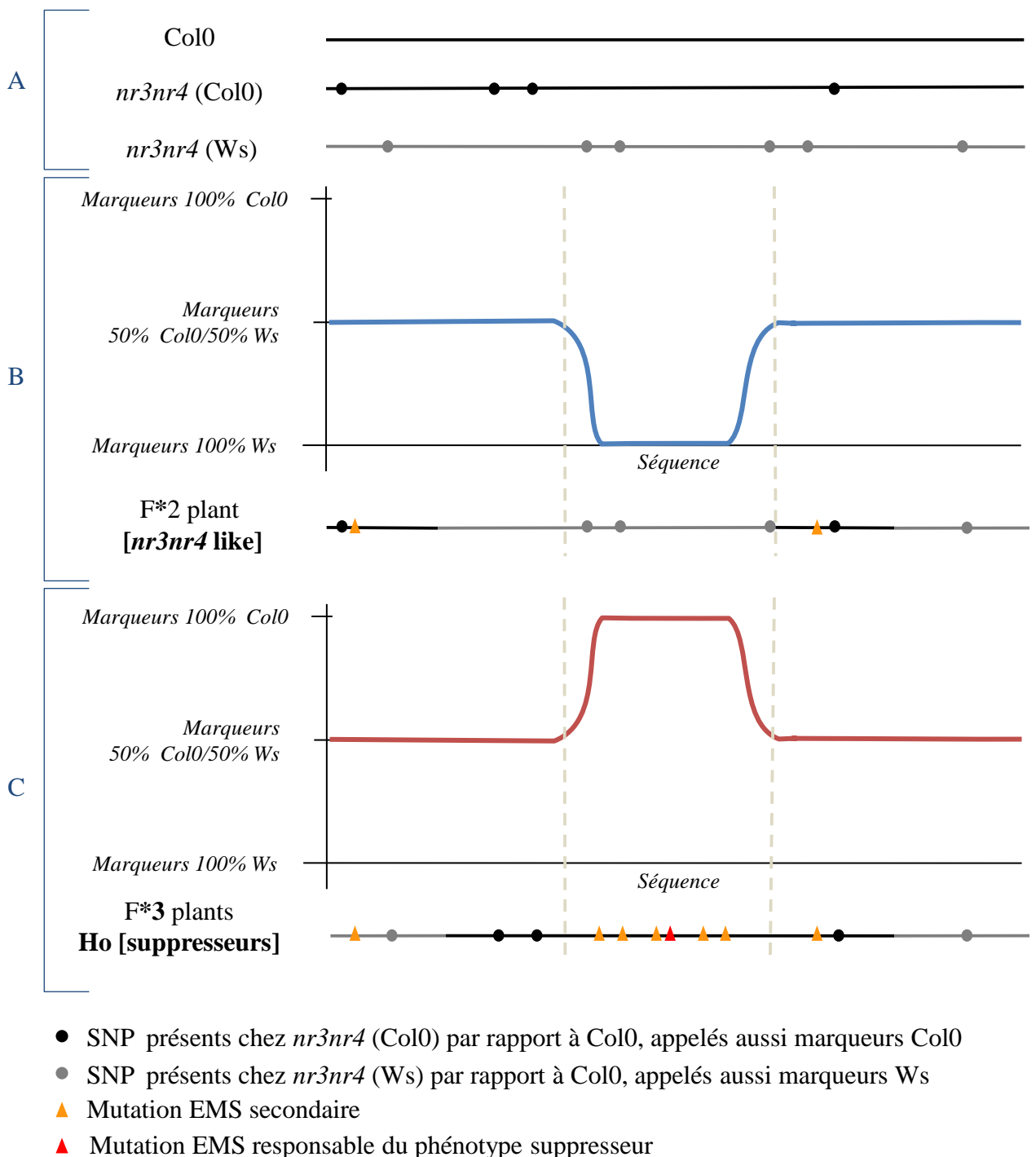


Figure 26 : Schéma représentant le principe de la recherche de variants/SNP, de la cartographie de la zone où se trouve la mutation et identification d'une mutation dominante responsable du phénotype supprimeur. On procède par comparaison de séquences. Nous disposons des séquences de Col0 (génomme de référence), *nr3nr4* (Col0) (fond mutant sur lequel la mutagenèse a eu lieu) et *nr3nr4* (Ws) (fond utilisé pour créer la population de cartographie) (A). Le séquençage des plantes F2 issues des rétrocroisements entre le candidat et *nr3nr4* (Col0) puis du croisement avec *nr3nr4* (Ws) mais ne présentant pas le phénotype supprimeur permet de cartographier la zone enrichie en marqueurs Ws. C'est sur cette zone qu'il faut focaliser les recherches de mutations de type EMS dans la population de F3 homozygotes supprimeurs. Sont représentés sous forme d'un graphique le pourcentage de SNP le long de la séquence ainsi qu'une séquence représentative de ces plantes F2 (B). Le séquençage des plantes F3 issues du même rétrocroisement mais homozygotes et avec le phénotype supprimeur permet d'identifier la mutation responsable du phénotype dans une région enrichie en mutations EMS et en marqueurs Col0. Sont représentés sous forme d'un graphique le pourcentage de SNP le long de la séquence ainsi qu'une séquence représentative de ces plantes F3 (C).

causant la suppression chez *isv4*. Une contamination par un allèle sauvage *AtNRAMP4* est certainement intervenue cours des croisements successifs.

Importance du génotypage à chaque étape de la sélection

Une des difficultés rencontrée lors de ce crible a été la nécessité de vérifier à chaque étape le fond génétique double mutant *nramp3nramp4* homozygote pour chacun des candidats.

Des défauts dans le génotypage nous ont amenés à perdre beaucoup de temps en travaillant sur le mutant *isv4* pour finalement séquencer des faux positifs, comportant un allèle sauvage d'*AtNRAMP4*. Ceci m'a conduit à mettre au point une technique de génotypage fiable des allèles mutants *nramp3* et *nramp4*. Mes essais utilisant les amorces NRAMP3_fw1, NRAMP3_rev1 et LBb1 ou LBa1 sur *AtNRAMP3* et les amorces NRAMP4_fw1, NRAMP4_rev1 et Lba1 ou NRAMP4_fw1, NRAMP4_rev5 et LBb1 sur *AtNRAMP4* ont montré que, dans ce cas, le génotypage ne peut se faire en une unique PCR par gène en mélangeant deux amorces spécifiques du gène et une amorce spécifique de la bordure alors que cela est souvent possible. En fait, le génotypage fiable des allèles *nramp3-2* et *nramp4-2* obtenues par insertion d'ADN-T dans l'accèsion Col0 nécessite 3 PCR indépendantes par gène (voir le Matériel et méthodes). Ces contrôles sont indispensables afin d'éliminer tous les faux positifs mais également les contaminants possibles dans les lots de graines.

Le test *in vitro* des graines M3 sur – Fe + 50 µM ferrozine a permis de confirmer 32 candidats. Nous avons choisi de génotyper les F1 des rétrocroisements pour 26 de ces 32 candidats. En effet si la F1 est homozygote pour les loci *nramp3* et *nramp4*, cela indique que le candidat et le mutant *nramp3nramp4* utilisés pour le rétrocroisement l'étaient et que la F2 le sera. Pour chacun des candidats, nous avons déterminé le génotype de trois plantes F1. Les plantes F1 de 11 candidats se sont avérées hétérozygotes pour le gène *NRAMP3* et/ou *NRAMP4*. Six F1 restent à génotyper. Pour 9 des candidats confirmés, nous disposons actuellement de plantes F1 homozygotes mutants aux deux loci (voir Annexe 2).

	<i>nr3nr4</i> (Col0)	Population F2 non suppresseur	Population F3 homozygote suppresseur
Nombre de paires de lecture produites	72 284 594	62 948 400	76 152 524
Nombres de paires de lecture alignées sur le génome de référence	54 856 769 soit 75,89% des reads	44 776 530 soit 71,13% des reads	51 857 290 Soit 68,10% des reads
Nombre de paires de lecture correspondant au génome chloroplastique	6 988 091 Soit 9,66% des reads totales et 12,74% des reads alignées	8 684 851 Soit 13,79% des reads totales et 19,39% des reads alignées	7 686 745 Soit 10% des reads totales et 14,8% des reads alignées
Nombres de variants détectés par la « quality-based » méthode *	9 296	404 044	441 093

Tableau 4 : Résultats chiffrés du traitement des données de séquençage haut-débit.

Nombre de paires de lecture produites, nombre de paires de lecture alignées sur le génome de référence Col0, nombre de paires de lecture produites correspondant au génome chloroplastique (afin de déterminer la contamination du génome nucléaire), nombre de variants détectés par la « method quality-based » (*tous les types de variants confondus : SNV (Single-Nucleotide Variant), MNV (Muti-Nucleotide Variant), deletion, insertion)

Chapitre 2 : ARTICLE SOUMIS

« Bypass of iron storage in endodermal vacuoles rescues the iron mobilization defect in the *nramp3nramp4* double mutant »

Identification du locus suppresseur via la distribution du fer dans les embryons

Au vu des patrons de distribution du fer rappelant le phénotype du mutant *vit1-1* chez les candidats *isv1*, *isv2* et *isv3*, nous avons émis l'hypothèse qu'une mutation EMS dans le gène VIT1 pourrait être responsable du phénotype suppresseur.

Nous avons amplifié et séquencé la séquence codante complète de VIT1 chez *isv1* et *isv2*. Nous observons que les deux candidats présentent une modification de la séquence nucléotidique menant à une perte de fonction de VIT1 responsable du phénotype suppresseur. Ces deux candidats font l'objet d'une publication intégrée ci-dessous.

J'ai réalisé moi-même l'essentiel des expériences rapportées dans ce manuscrit. Magali SR a participé à la sélection initiale des mutants. Jérôme G a généré le triple mutant *nramp3nramp4vit1-1*. Astrid A a réalisé les dosages de pigments. Sun A K et Mary Lou G nous ont transmis les graines du mutant *vit1-1*, les plasmides d'expression en levures et *in planta*, l'anticorps anti-VIT1. Colin C a participé à la classification des mutants en fonction de leur patron de répartition du fer. Sylvain M m'a apporté son expérience en génétique à différentes étapes du projet. Avec Sébastien T, nous avons conçu les figures et écrit le manuscrit qui a été relu par l'ensemble des auteurs.

Concernant le candidat *isv3*, aucune modification de la séquence codante de VIT1 n'a été détectée. Nous ne disposons actuellement pas d'une F1 homozygote mutante : les plantes F1 testées se sont avérées hétérozygotes pour le gène *NRAMP3* et/ou *NRAMP4*. Il faudra donc revenir aux graines M3 encore disponibles et les génotyper avant de générer de nouvelles F1 issues de rétrocroisements.

1 **Running head:** *iron storage in Arabidopsis seeds*

2 **Correspondance to:**

3 Sébastien Thomine,

4 Institute for Integrative Biology of the Cell,

5 1, Avenue de la Terrasse,

6 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

7 Tel. +33 1 69 82 36 87.

8 Email: thomine@isv.cnrs-gif.fr

9

10 **Research area:** Membranes, Transport and Biogenetics

11

Bypass of iron storage in endodermal vacuoles rescues the iron mobilization defect in the *nramp3nramp4* double mutant

Viviane MARY¹, Magali SCHNELL RAMOS¹, Cynthia GILLET¹, Jérôme GIRAUDAT¹, Astrid AGORIO¹, Sylvain MERLOT¹, Colin CLAIRET¹, Sun A. KIM², Mary Lou GUERINOT², Sébastien THOMINE¹

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Saclay Plant Sciences, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette, F-91198, France

² Department of Biological Sciences, Dartmouth College, Hanover, NH 03755, USA

Summary

Combining genetics and metal imaging, this work identifies mutations in transporters controlling iron storage in Arabidopsis embryo vacuoles, which modify both tissue specific and subcellular localization of seed iron.

Footnote:

This work was supported by the CNRS, by ANR-07-BLAN-0110 and ANR-2011-BSV6-00401 grants to S. T. and a doctoral grant from the French Ministry of Research and Technology to VM.

Author for correspondance:

Sébastien Thomine,
Email: thomine@isv.cnrs-gif.fr

37 **Abstract**

38 To improve seed iron (Fe) content and bioavailability, it is crucial to decipher the mechanisms
39 that control Fe storage during seed development. In *Arabidopsis thaliana* seeds, most Fe is
40 concentrated in insoluble precipitates with phytate in the vacuoles of cells surrounding the
41 vasculature of the embryo. AtNRAMP3 and AtNRAMP4 function redundantly in Fe retrieval
42 from vacuoles during germination. When germinated under Fe deficient conditions,
43 development of the *nramp3nramp4* double mutant is arrested as a consequence of impaired Fe
44 mobilization. To identify novel genes involved in seed Fe homeostasis, we screened an EMS
45 mutagenized population of *nramp3nramp4* seedlings for mutations suppressing their
46 phenotypes on low Fe. Here, we report that among the suppressors, two mutants carried
47 mutations in the *AtVIT1* gene causing the suppressor phenotype. The AtVIT1 transporter is
48 involved in Fe influx into vacuoles of perivascular cells. This result establishes a functional
49 link between Fe loading in perivascular vacuoles by AtVIT1 and its remobilization by
50 AtNRAMP3 and AtNRAMP4. Moreover, analysis of subcellular iron localization indicates
51 that simultaneous disruption of AtVIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4 limits iron
52 accumulation in vacuolar globoids.

53

54

Introduction

Iron (Fe) is an essential micronutrient. In cells, this metal may change between two oxidation states: ferrous iron Fe^{3+} and ferric iron Fe^{2+} . Thanks to this property, iron is an important metal cofactor for electron transfer in many biochemical reactions. However, for the same reason, free iron generates harmful reactive oxygen species *via* the Fenton reaction (Haber and Weiss, 1932; Halliwell, 1978). Cells thus need to tightly control Fe homeostasis through chelation and compartmentalization. For example, in *Saccharomyces cerevisiae*, the membrane transporter ScCCC1 transporter is required to move excess Fe into the vacuole (Li et al., 2001). The Δccc1 mutant is sensitive to extracellular iron. In mammalian cells, the excess of cytosolic iron is complexed by ferritins; the assembly of 24 ferritin forms a hollow complex able to safely store up to 4500 Fe(III) atoms (Finazzi and Arosio, 2014).

Iron deficiency is an important public health issue: two billion people, corresponding to over 30% of the world population, are anemic (WHO resources). To fight iron deficiency, it has been proposed to develop crops with more available iron according to a strategy called biofortification (Bouis, 2003). In most crops, seeds are used as food or feed. Iron stores in seeds are also important for the germination of seedlings. In seeds, Fe may be associated with ferritin in plastids, with phytate in vacuoles or with nicotianamine. Although Fe complexed with ferritin or nicotianamine is considered as highly bio-available, Fe-phytate is insoluble and poorly bio-available (Clemens, 2014).

In *Arabidopsis thaliana* seeds, no more than 5% of the total seed Fe is associated with ferritin (Ravet et al., 2009). About 50% of seed iron is concentrated in the vacuoles of the cells surrounding the vasculature (Lanquar et al., 2005; Kim et al., 2006; Roschztardt et al., 2009; Schnell Ramos et al., 2013). AtVIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1) is responsible for the loading of iron during seed development (Kim et al., 2006). Loss of AtVIT1 function perturbs the cell type specific localization of iron in mature embryos: in *vit1-1* knockout mutants, Fe is no longer concentrated in cells surrounding the vasculature of the hypocotyl, radicle, and cotyledons but instead it is accumulated in cortical cells in the hypocotyl and radicle, and in the subepidermal cells of the abaxial side of cotyledons (Kim et al., 2006). Loss of AtVIT1 function also has an impact on germination on alkaline (pH 7.9) soil: *vit1-1* mutant seedlings grow poorly compared to wild-type (Kim et al., 2006). AtNRAMP3 and AtNRAMP4 (Natural Resistance Associated-Macrophage Protein 3 and 4) function redundantly in the mobilization of seed iron from vacuoles during germination (Lanquar et al., 2005). Even though iron content and localization are unaffected in mature seeds of the *nramp3nramp4* (*nr3nr4*) double knockout (KO) mutant (Schnell Ramos et al., 2013), seedlings of this mutant displays strong

defects when grown on an iron deficient medium: they are chlorotic and their development is arrested (Lanquar et al., 2005).

When associated to phytate in vacuolar globoids, Fe is insoluble and notoriously poorly available for animal nutrition (Clemens, 2014). To identify mutations that limit Fe storage in this compartment, we generated an EMS mutagenized population of the *nr3nr4* mutant and looked for mutations that restore growth on iron deficient medium. We called these mutants *isv* for “bypass iron storage in vacuoles”.

Here, we report the characterization of two *isv* mutants displaying iron distribution patterns similar to the *vit1-1* mutant. These mutants carry mutations in the *AtVIT1* gene. By genetic analysis, we demonstrate that the mutations in *AtVIT1* are responsible for the suppression phenotype. They define two new *vit1* loss-of-function alleles: the *vit1-2* allele in *isv1* mutant carries an amino acid change in the AtVIT1 protein leading to a non-functional protein, and the *vit1-3* allele in *isv2* mutant modifies the first intron splicing consensus sequence leading to non-functional RNAs or proteins. Whereas NRAMP3 and NRAMP4 are necessary for retrieving iron from vacuoles in the wild type background, they are not necessary for using iron in a *VIT1* loss-of-function background. Actually, combining *nramp3*, *nramp4* and *vit1* mutations modifies Fe localization at the tissue and subcellular levels. These changes likely account for the ability of *vit1* mutations to rescue Fe mobilization and growth in the *nr3nr4* background.

Material and Methods

Plant materials

Generation of *nr3nr4* and *vit1-1* T-DNA insertion mutants has been described previously (Kim et al., 2006; Ravet et al., 2009; Molins et al., 2012). To obtain the *nramp3nramp4vit1-1* triple mutant, the *nr3nr4* was crossed with the *vit1-1* mutant and the F2 progeny was analyzed by PCR genotyping to select homozygous plants at the 3 loci.

Plant growth conditions

Arabidopsis seedlings were grown on ABIS medium (containing 2.5 mM H₃PO₄, 5 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, Murashige and Skoog microelements, 1% sucrose, 1% Phytagel (primary root length experiment) or 0.7% Phytoagar (all other experiments), 1 mM MES adjusted with KOH to pH 6.1). For Fe sufficient medium, 50 µM FeHBED was added after autoclaving. FeHBED was prepared as a 10 mM stock solution from FeCl₃ (Sigma, Saint Louis, MO) and HBED (N,N'-di(2-hydroxybenzyl)ethylene diamine-N,N'-diacetic acid monochloride hydrate) (Strem Chemicals, Newburyport, MA). HBED was added

with a 10% excess to ensure that all Fe was chelated. To deplete the medium with Fe, Fe was omitted (primary root length experiment, “- Fe”) or Fe was omitted and 50 μ M ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine] was added to the ABIS medium (all other experiments, “- Fe + 50 μ M Fz”). Plates were placed vertically (primary root length experiment) or horizontally (all other experiments) in environmental growth chambers (Sanyo MLR-350, Morigushi, Japan) at 21°C with a 16 h photoperiod under 120 μ mol photon \cdot m⁻²·s⁻¹.

EMS mutagenized nr3nr4 population production and screening conditions

A M0 population of 25 000 seeds of the *nr3nr4* double KO mutant was treated with 0.15% of EMS during 16 h and rinsed 8 times with about 120 mL distilled water and one last time with 500 mL distilled water to obtain M1 seeds. M1 seeds were sown by pool of 50 per pot and grown in a greenhouse to obtain batches of M2 seeds originating from 50 M1 seeds. 800 seeds of each M2 batch were sown on two 12*12 cm plates (corresponding to a density of 5-6 seeds by cm²) containing - Fe + 50 μ M Fz ABIS medium. Seedlings able to grow on this medium were selected after 3, 4 or 7 days of germination and transferred first to Fe sufficient ABIS medium for recovery and then to pots and grown in the greenhouse to obtain M3 seeds. The inheritance of the suppressor phenotype was then tested by germinating M3 seeds on - Fe + 50 μ M Fz ABIS medium.

Iron staining in embryos and seedlings during germination

To examine iron localization in mature embryos and seedlings, Perls/DAB staining was performed according to Roschztardt *et al.*, 2009. Mature embryos were obtained by dissection of seeds imbibed in water, in the dark, at 4°C for one night. Seedlings used for monitoring iron mobilization during germination were sown on – Fe + 50 μ M Fz ABIS medium.

Chlorophyll analysis

After grinding the leaves in liquid nitrogen, pigments were extracted in 1 mL ethanol at room temperature for 30 min. After centrifugation at 19 000 g for 10 min at room temperature the supernatant was recovered and stored overnight at -20°C. The supernatant was then centrifuged at 19 000 g for 5 min at room temperature, pigment content was determined spectrophotometrically from the absorbance measured at 534, 643 and 661 (Porra *et al.*, 1989).

VIT1 PCR amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted as described (Edwards *et al.*, 1991). Primers VIT1_for2 (5'-ACCACAAGACATGCAACAAAC-3') and VIT1_rev1 (5'-TTCCCACACACACACTTCACAA-3') were used to amplify the coding sequence of *AtVIT1* gene.

Primers VIT1_for2, VIT1_rev1, VIT1_for3 (5'-GAATCTCTGCCACTTCAG-3') and VIT1_rev3 (5'-CCTGAAACTGGTAAGACC-3') were used to sequence the PCR amplicon (GATC, Köln, Germany).

RNA extraction and RT-PCR analysis

RNA was extracted from 12-15 green siliques using PowerPlant® RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. DNase treatment was performed by applying 5 µL RNase free DNase at 5 U/µL (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) on nucleic acid binding columns. RNA was eluted with 100 µL RNase-free water. One µg RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III First-Strand Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) with random hexamers. For RT-PCR analysis, VIT1qPCREx1 (5'-CGGAGAAATC GTACGTGACA-3') and VIT1qPCREx4 (5'-GTAACGGTATAAAACC GCCAAG-3') were used to amplify VIT1 transcripts. Actin2_fwq (5'-GGTAACATTG TGCTCAGTGGTGG-3') and Actin2_revq (5'-AGCATGAAGATTAAGGTCGTT-3') were used to amplify actin as a reference. After an initial denaturation step of 5 min at 94°C, PCR amplification proceeded with 35 cycles (*VIT1*) or 25 cycles (*ACTIN2*) of denaturation (30 sec at 94°C), hybridization (30 sec at 60°C) and extension (30 sec at 72°C) and a final extension of 5 min at 72°C.

Functional expression in yeast

S. cerevisiae strains used in this study were $\Delta ccc1$ (*MATa*; *ura3-53*, *leu2-3,112*, *trp1-1*, *his3-11*, *ade2-1*, *can1-100*, $\Delta ccc1::HIS3$) and the corresponding WT, DY150 (Li et al., 2001). The mutated VIT1 version (or VIT1^{G77D}) was generated using the QuikChange® II KL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene®, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) with mutagenic primers VIT1yeast_3-4-for (5'-CCCATGGAGATAGCATCGGCCGCGACTTCGG-3') and VIT1yeast_3-4_rev (5'-CCGAAGTCGCGGCCGATGCTATCTCCATGGG-3').

$\Delta ccc1$ cells were transformed with either the empty m3838 vector, as negative control, or plasmids containing *VIT1* cDNA from *Arabidopsis* native or VIT1^{G77D} (fused or not to GFP) under the control of the *MET25* promoter by the lithium acetate method (Gietz et al., 1992; Kim et al., 2006). Transformed $\Delta ccc1$ cells were selected on SD-Ura-His medium. Complementation of $\Delta ccc1$ was tested by spotting serial dilutions of each yeast strain on SD-Ura medium supplemented or not with 5 mM or 10 mM FeSO₄. Plates were placed at 30°C for 2 days.

Metal analyses in dry seeds

Three or four replicates of about 20 mg of dry seeds were digested in 2 mL of 70% nitric acid

in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 80°C for 1 h, 100°C for 1 h, and 120°C for 2 h. After dilution to 12 mL with ultrapure water, Ca, Fe, Mg, Mn and Zn contents of the samples were determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

High-pressure freezing, Freeze substitution and embedding

After mechanical removal of the seed tegument, the embryos were high-pressure frozen with hexadecane as cryoprotectant, in 200 µm depth carriers with EMPACT2 (Leica Microsystems). Freeze-substitution was performed in AFS2 (Leica Microsystems) in 2% glutaraldehyde in anhydrous acetone for 4 days adapted from (Otegui et al., 2002). Samples were infiltrated in Epon at RT as follow: 5% (v/v) resin in acetone (4 h), 10% resin (4 h), 25% resin (16 h), and 50, 75, and 100% resin (24 h at each concentration). Polymerisation was performed at 60°C for 18 h.

Sectioning and EDX studies

Cotyledons were sectioned along the transverse plane with a 45° HISTO diamond knife (Diatome). 500 nm sections were collected on formvar carbon-coated 75 mesh copper grids. Energy-dispersive X-ray (EDX) studies were performed with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope operating at 120 kV and equipped with SAMx silicon drift detector (10 mm², resolution 128 eV) with Peltier cooling system and IDFix software. Spectra were acquired for 120 s at 12,000 magnification at spot size 2 (2 µm beam diameter), with the section tilted 10° toward the detector. Iron data represent the integrated sum of net counts between 6.34 and 6.47 KeV (FeKα 6.4) and Manganese data between 5.83 and 5.96 keV (MnKα 5.9). Nets counts were obtained by subtracting the background from the peaks. Two samples per genotype were analyzed. For each section, we analyzed at least 5 endodermal cells and 5 subepidermal cells of the abaxial side of cotyledons. For each cell, spectra was obtained on globoids and in the cytosol.

Results

Identification of mutants displaying restored growth on low Fe in a mutagenized population of nramp3nramp4 seedlings

Screening 288 000 M2 seeds representing the progeny of 18 000 M1 plants, we selected 127 candidates of which 32 suppressors could be confirmed at the M3 generation. To classify the candidates, the iron distribution pattern of their embryos was determined using Perls/DAB staining (Roschztardt et al., 2009). On this basis, three classes could be established: most candidates displayed an iron distribution pattern similar to wild type (WT); in some candidates, no staining could be observed and 3 candidates displayed a disturbed iron distribution pattern.

Identification of two new vit1 mutant alleles on the basis of their Fe distribution pattern

Among the candidates, we focused on *isv1* and *isv2*, which both display perturbed iron distribution in their embryos. In both *isv1* and *isv2*, chlorosis and developmental arrest phenotypes of the *nr3nr4* double mutant on low iron medium were partially suppressed (Figure 1A). When germinated on Fe sufficient medium, WT, *nr3nr4*, *isv1* and *isv2* seedlings contained equal amounts of chlorophyll. In contrast, under Fe deficient conditions, chlorophyll could not be detected in *nr3nr4*, whereas *isv1* and *isv2* seedlings contained 20.56 and 18.22 pmol chlorophyll per plant respectively, which corresponds to about 13 and 11% of the content measured in WT seedlings in the same conditions (Col-0, Figure 1B). To quantify the impact of *isv1* and *isv2* mutations on seedling development after germination, we measured the primary root length of 12-day-old seedlings. As expected, root lengths were similar for all the genotypes under Fe sufficiency. On - Fe medium, *isv1* and *isv2* overcome the complete developmental arrest observed in *nr3nr4* allowing root elongation to 74 and 54% of the WT respectively (Figure 1C).

To determine whether *isv1* and *isv2* mutations are dominant or recessive, we backcrossed *isv1* and *isv2* with *nr3nr4*. On - Fe medium, out of 90 seedlings of F2 generation from *isv1xnr3nr4* cross, 26.6% showed a suppressor phenotype and, out of 94 seedlings of F2 generation from *isv2xnr3nr4* cross, 20.2% showed a suppressor phenotype. The segregations observed are compatible with recessive single locus based on X^2 values 0.71 for *isv1* and 0.28 *isv2*.

Figure 2 shows that *isv1* and *isv2* mutant embryos display iron distribution patterns very similar to the pattern reported for the *vit1-1* mutant (Roschztardt et al., 2009). We thus tested whether *isv1* and *isv2* carry a mutation in the *AtVIT1* gene. We amplified and sequenced the *VIT1* gene in *isv1*, *isv2* and WT. Sequence analysis revealed that *isv1* and *isv2* carry 2

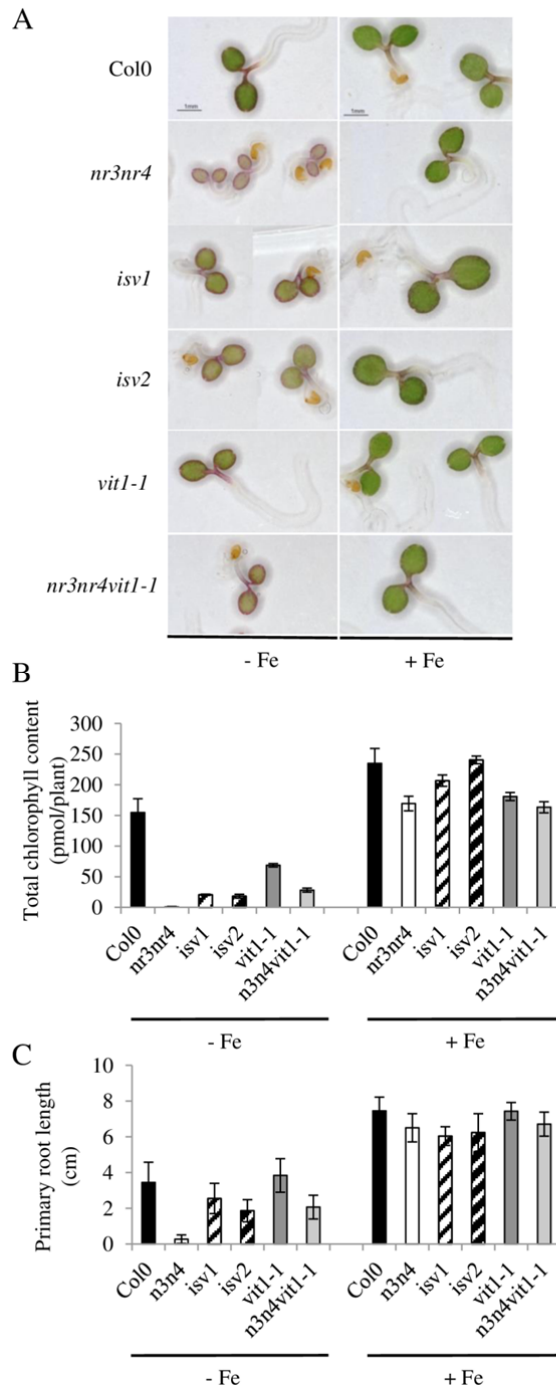


Figure 1: *isv1*, *isv2* and *nr3nr4vit1-1* suppress chlorosis and developmental arrest phenotypes of *nr3nr4* on low iron medium after germination.

A, 5 day-old grown in ABIS medium without iron (- Fe + 50 μ M Ferrozine) or with iron (+ 50 μ M Fe) seedlings of WT (Col0), *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* candidates. Scale bar : 1 mm. B, Total chlorophyll content. C, Primary root length of 12 day-old grown in ABIS medium without iron (- Fe) or with iron (+ 50 μ M Fe) seedlings of WT (Col0), *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* candidates.

251 different point mutations corresponding to EMS mutagenesis in the *VIT1* genomic sequence
 252 (Figure 3). In *isv1*, a change from G to A at nucleotide 243 led to an amino-acid change in the
 253 second predicted transmembrane domain: the glycine (G) 77 was replaced by an aspartate (D)
 254 (Figure 6A). In *isv2*, a G to A conversion at nucleotide 699 affected the predicted acceptor site
 255 for the splicing of the first intron.
 256 The triple knockout mutant *nramp3nramp4vit1-1* recapitulated the phenotype of *isv1* and *isv2*

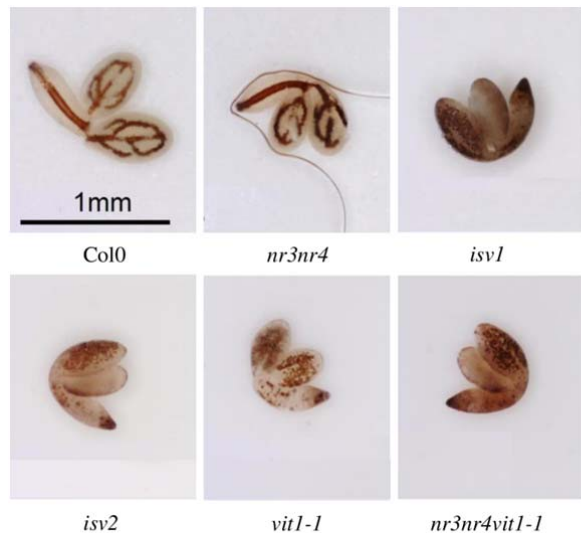


Figure 2 : *isv1*, *isv2* , T-DNA mutants *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* display similar iron distribution patterns in embryos. Perls/DAB staining of embryos from Col0, *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* mature seeds.

on low Fe medium.

To test whether loss of *VIT1* function could suppress the *nr3nr4* phenotype, we constructed the *nr3nr4vit1-1* triple mutant by combining knockout insertion alleles of the three genes. On Fe deficient medium, the triple knockout mutant displayed a phenotype intermediate between the WT Col0 and *nr3nr4* (Figures 1A, B, C), similar to *isv1* and *isv2*. In agreement with a previous report showing a growth defect on alkaline soil (Kim et al., 2006), *vit1-1* single mutant growth and greening was also impaired on Fe deficient medium. Its phenotype was intermediate between Col-0 and the triple mutant *nr3nr4vit1-1*. On Fe sufficient medium, *vit1-1* was indistinguishable from WT Col0 (Figures 1A, B and C). Moreover, the iron distribution pattern revealed by Perls/DAB staining of *nr3nr4vit1-1* was similar to the iron pattern in the *vit1-1* single mutant, as observed in *isv1* and *isv2* (Figure 2). These results establish that loss of *VIT1* function suppress the defects observed in *nr3nr4* mutant germinated on low Fe medium.

The mutations in AtVIT1 gene sequence are responsible of the suppressor phenotype in isv1 and isv2 mutants.

To confirm that the EMS mutations found in *AtVIT1* gene in *isv1* and *isv2* are responsible for the suppressor phenotype on low Fe medium, we performed an allelic complementation test by crossing the triple knockout mutant *nr3nr4vit1-1* with *isv1* and with *isv2*. Allelic complementation tests allow determining whether two recessive mutants carry mutations in the same or in different genes. If the recessive mutations are in the same gene, the F1 generation is expected to display the suppressor phenotype. In contrast, if the *nr3nr4*

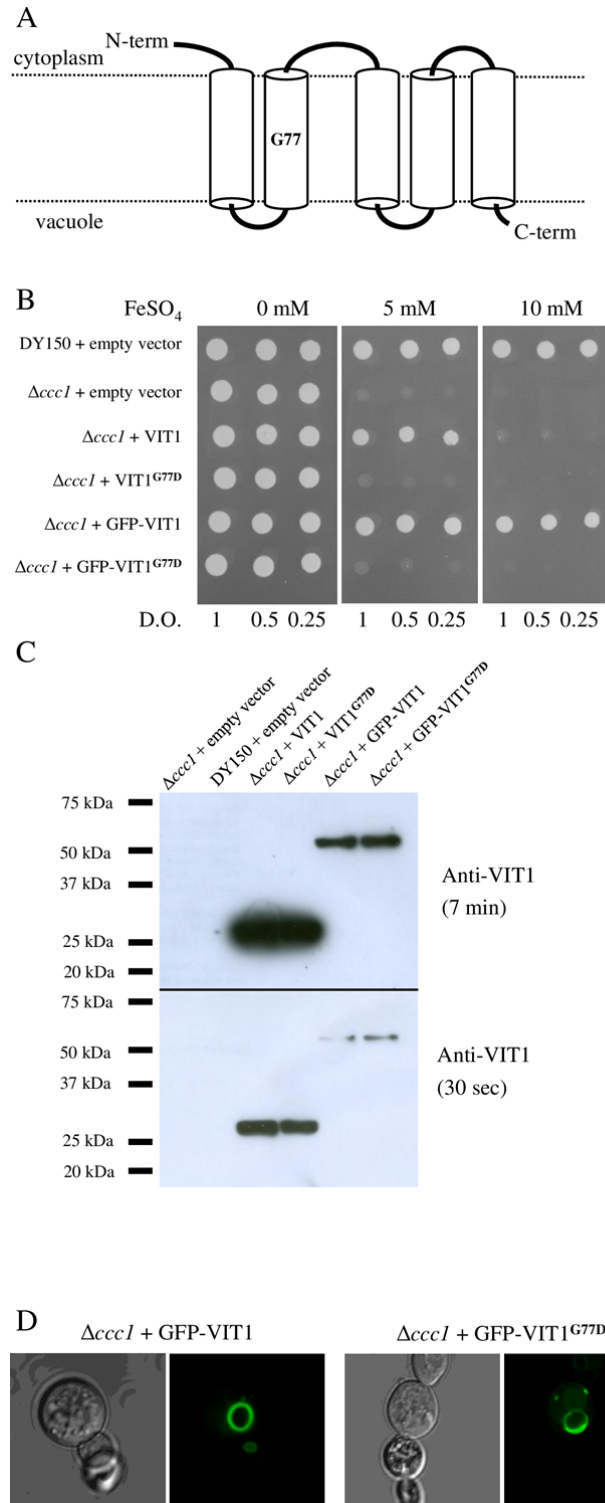


Figure 6 : The VIT1 G77D transporter does not rescue the $\Delta ccc1$ yeast mutant.

A, Predicted topology of the VIT1 transporter. Localization of Glycine 77 in the middle of the second transmembrane domain. B, Yeast drop test. AtVIT1, AtVIT1^{G77D} and their corresponding GFP fusion proteins were expressed in $\Delta ccc1$ mutant. The complementation was scored by spotting serial dilutions of yeast transformants on selective medium (SD -Ura) supplemented or not with 5 mM or 10 mM of FeSO₄. WT strain (DY150) and $\Delta ccc1$ mutant transformed with an empty vector are used as controls. C, Immunoblot analysis with antibody against VIT1 on protein extracts from strains used for the drop test. As the time for detection of GFP fusion protein is longer than for the native version, two exposures are shown: At the top, blot exposed 7 min and at the bottom, blot exposed 30 sec. D, Localization of the GFP fluorescence signal in $\Delta ccc1$ yeast mutant cells transformed with the WT or G77D version of VIT1-GFP by confocal microscopy.

phenotype is observed in F1 generation, the two recessive mutations causing the suppression are not in the same gene. We sowed F1 generation seeds from *nr3nr4vit1-1* x *isv1*, *nr3nr4vit1-1* x *isv2* and *isv1* x *isv2* crosses on - Fe medium (Figure 5). We observed that all seedlings display an intermediate phenotype reminiscent of the triple *nr3nr4vit1* knockout or the *isv1* and *isv2* mutants (Figure 4). Taken together, these results establish a causal link between the

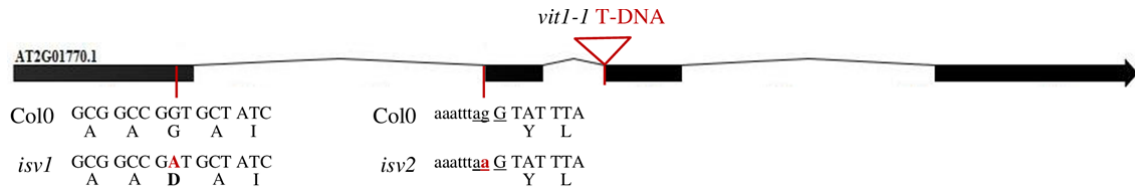


Figure 3: *isv1* and *isv2* carry mutations in the *VIT1* gene. Position of *isv1* and *isv2* mutations and T-DNA insertion of the *vit1-1* mutant on the *VIT1* genomic DNA sequence (black bars stand for exons, black lines for introns and mutations are indicated in red).

mutations found in *VIT1* gene in *isv1* and *isv2* and the suppressor phenotype; *isv1* and *isv2* correspond to *nr3nr4vit1-2* and *nr3nr4vit1-3*, respectively.

The vit1-3 mutation prevents the production of functional AtVIT1 mRNA in isv2

As *isv2* (*nr3nr4vit1-3*) mutants carry a mutation in the acceptor site involved in the splicing of the first intron of *VIT1*, we investigated the effect of *vit1-3* mutation on *VIT1* mRNA using RT-PCR. Experiments were carried out using primers that amplify a fragment of *VIT1* spanning all three introns, and *ACTIN2* as a reference gene. The results presented in Figure 5 show an amplicon at the expected size (461 bp) for the spliced transcript in Col-0 and *nr3nr4* double mutants (band *b*) and no amplification at this size in *vit1-1* mutant as expected. The high molecular weight band observed in Col0, *nr3nr4* and *nr3nr4vit1-3* (band *a*) corresponds to the size of genomic DNA (1359 bp) or to an unspliced version of the mRNA. An amplicon at the expected size (461 bp) for the spliced transcript (band *b*) was also observed in *isv1* (*nr3nr4vit1-2*). In *nr3nr4vit1-3*, two amplicons were present in addition to band *a*, one matching the size of a modified form of mRNA where the first intron is not spliced (band *c*, 893 bp) and one at the expected size for the properly spliced RNA (band *d*). Sequencing of these amplicons confirmed the identity of the high MW band (*c*) and revealed that, in the band at the correct size (band *d*), 8 nucleotides are missing introducing a frame shift in the cDNA. In contrast, the sequence of the amplicon at the same size (*b*) in Col0, *nr3nr4* and *nr3nr4vit1-2* corresponds to the predicted cDNA. Both mRNAs detected in *nr3nr4vit1-3* contain premature stop codons and are predicted to give rise to proteins truncated after Tyr90 and Ser108, with homology to VIT1 interrupted after Gly85. The *vit1-3* mutation led to the production of two non-functional mRNA of *VIT1*, while *vit1-2* mutation did not impair *VIT1* mRNA production.

The G77D mutation impairs the ability of AtVIT1 to transport Fe in yeast.

To examine the iron transport activity of AtVIT1^{G77D} (*vit1-2*), we compared the ability of AtVIT1 and AtVIT1^{G77D} to complement the $\Delta ccc1$ yeast mutant on high Fe medium. AtVIT1 is a functional homologue of yeast ScCCC1 (Kim et al., 2006). The $\Delta ccc1$ mutant is sensitive

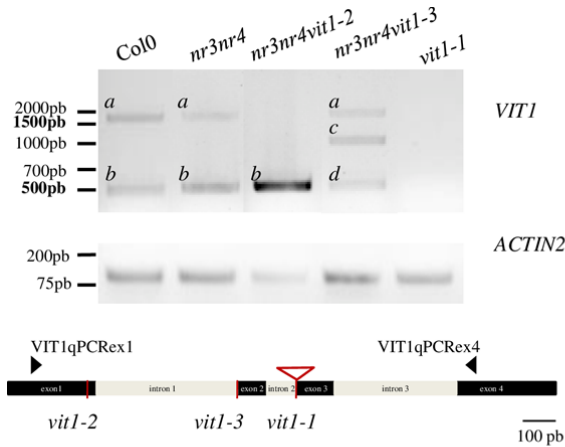


Figure 5 : Effects of *vit1-2* and *vit1-3* mutations on *VIT1* mRNA structure. RT-PCR on cDNA from siliques of *nr3nr4*, *nr3nr4vit1-1*, *nr3nr4vit1-2* and *nr3nr4vit1-3*. Four different types of amplicons have been detected and sequenced: (a) residual genomic DNA or unspliced RNA, (b) mature mRNA, (c) mRNA with unspliced first intron and, (d) mis-spliced mRNA missing 8 nucleotides at the beginning of second exon.

to high extracellular iron concentrations and fails to grow on media containing elevated levels of iron (Li *et al.*, 2001). In agreement with a previous report (Kim *et al.*, 2006), $\Delta ccc1$ yeast strain growth defect on 5 mM or 10 mM FeSO_4 could be rescued by expression *AtVIT1* or *AtVIT1::GFP* (Figure 6B). In contrast, $\Delta ccc1$ yeast strain transformed with *AtVIT1*^{G77D} or *GFP::AtVIT1*^{G77D} versions were not able to grow on media supplemented with high concentrations of FeSO_4 (Figure 6B). Immunoblot using anti-VIT1 antibody did not reveal any difference between native VIT1 and VIT1^{G77D} protein levels in $\Delta ccc1$ (Figure 6C). Moreover, examination of VIT1-GFP by confocal microscopy did not provide any indication that the G77D mutation alters VIT1 localization (Figure 6D). Together, these results suggest that the G77 is a critical residue for VIT1 iron transport activity.

Subepidermal iron stores are efficiently mobilized during germination in the absence of AtNRAMP3 and AtNRAMP4

To understand by which mechanism mutations in *AtVIT1* rescue the growth of *nr3nr4* mutant seedlings on low iron, we examined the concentration and the fate of seed Fe stores in *nr3nr4vit1-1*. Measurements of iron concentrations in seeds did not reveal any significant difference between Col0, *nr3nr4*, *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* (Supplemental data Table I). To monitor Fe mobilization, we performed Perls/DAB staining on seedlings grown on – Fe during the first seven days after germination (Figure 7). As previously reported (Roschztardt *et al.*, 2009), in WT, the Perls/DAB staining around vascular tissues progressively disappeared after germination indicating that iron was mobilized (Figure 7). In parallel, cotyledons became green after 4 days. In contrast, the strong staining around the vasculature remained

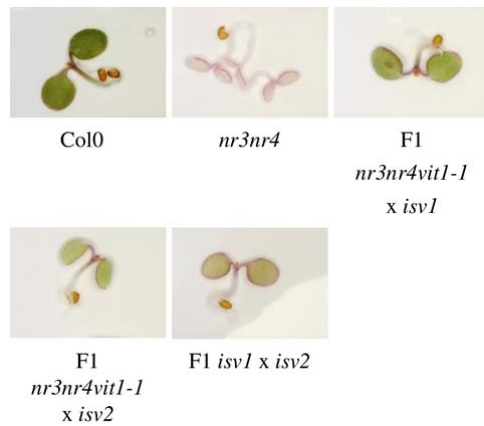


Figure 4 : The suppressor phenotype of *isv1* and *isv2* candidates is due to the mutations in *VIT1*. Four day-old seedlings grown in ABIS medium without iron (- Fe + 50 μ M Ferrozine) of WT, *nr3nr4* and F1 from crosses between *nr3nr4vit1-1* and *isv1*, *nr3nr4vit1-1* and *isv2* or between the 2 candidates.

even after 7 days in *nr3nr4* double mutant seedlings, confirming that this mutant is unable to remobilize iron. This was associated with extreme chlorosis and a developmental arrest. In *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* mature embryos, iron stores are located in the subepidermal cells on the abaxial side of the cotyledons and in the cortex of the radicle. During the first week of seedling development, the corresponding Perls/DAB staining disappeared with similar kinetics, indicating that Fe is efficiently mobilized in both single and triple mutants (Figure 7). Accordingly, *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* mutants were able to grow on – Fe medium and their cotyledons became green after 4 days. These data indicate that in the *vit1-1* mutant background, Fe may be mobilized from subepidermal cells of cotyledons and in the cortex of the radicle even in the absence of NRAMP3 and NRAMP4. This result provides a mechanism for the suppressor effect of VIT1 loss of function mutations in *nr3nr4*.

Subcellular localization of iron in cotyledon subepidermal cells

Our results indicated that Fe stored in cotyledon subepidermal cells is efficiently mobilized during germination in the absence of AtNRAMP3 and AtNRAMP4. This raises the question of the compartment in which iron is stored in the absence of VIT1. Is iron localized in vacuolar globoids and mobilized by distinct vacuolar metal exporters or is it stored in a different compartment? To address this question, we examined the subcellular localization of Fe and Mn in cotyledons from wild type, *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* triple mutant dry seeds using Energy Dispersive X-ray analysis (EDX) coupled to Transmission Electron Microscopy (TEM). As expected from previous work (Lanquar et al., 2005; Kim et al., 2006; Punshon et al., 2012; Schnell Ramos et al., 2013), Fe was highly concentrated in vacuolar globoids of perivascular cells in wild type embryos; Mn could not be detected by EDX in this cell type

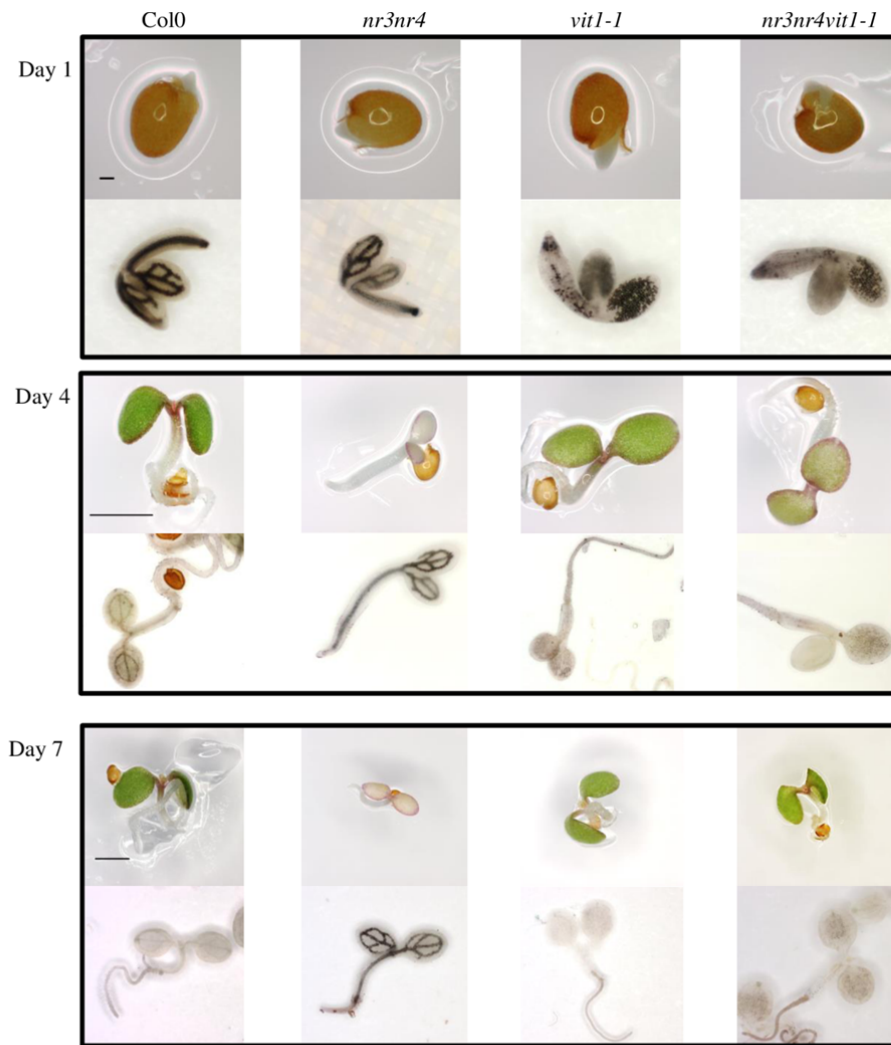


Figure 7 : Iron stores are efficiently remobilized during *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* mutant seedling development. Seedling development and iron localization were monitored in parallel during the 7 first days after sowing. For each panel, at the top, pictures of seedlings on low iron medium (ABIS – Fe + 50 μ M Fz) and at the bottom, Perls/DAB staining of Col0, *nr3nr4*, *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* (from left to right) 1, 4 or 7 days after transfer to the growth chamber. Scale bar: day 1 = 100 μ m, day 4 = 1 mm, day 7 = 1 mm.

and was concentrated in globoids from subepidermal cells (Figure 8, 9). Manganese subcellular localization is consistent with a recent spectroscopic analysis demonstrating Mn association with phytate in seeds (Bruch et al., 2015). Iron was also detected in the cytosol of perivascular and subepidermal cells as well as in subepidermal globoids albeit at much lower levels than in perivascular cell globoids (Figure 8, 9). In *vit1-1* mutant embryos, Fe and Mn were both concentrated in subepidermal cell globoids. Nevertheless, Fe could still be detected

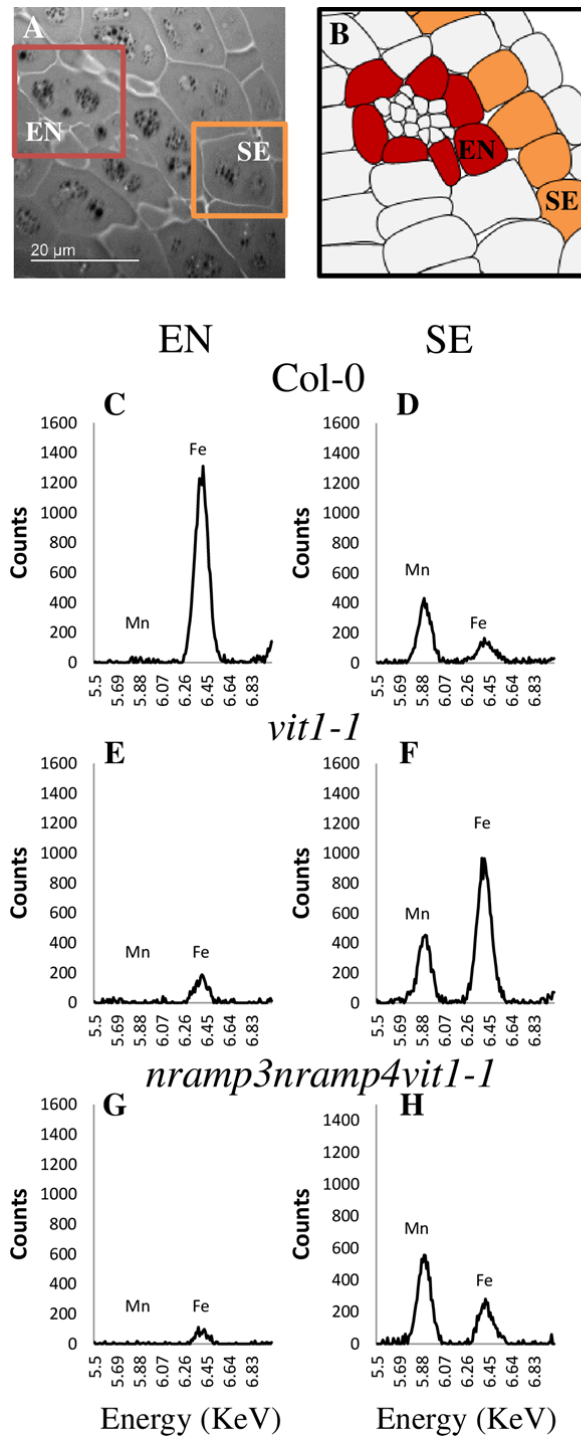


Figure 8 : Less Fe is associated to vacuolar globoids of subepidermal cells in the *nramp3nramp4vit1-1* than in the *vit1-1* mutant. Analysis of Fe and Mn content in vacuolar globoids in embryo from dry seeds using TEM-EDX. A, TEM micrograph of a 500 nm thick transverse section through a cotyledon. B, schematic representation of the section. EN, endodermal/bundle sheath cell (red). SE, subepidermal cell (orange). C-H representative spectra at the energies of Mn and Fe emissions with beam focused on globoids from bundle sheath cells (C, E, G) or subepidermal cells (D, F, H) in wild type (C, D), *vit1-1* (E, F) or *nramp3nramp4vit1-1* (G, H).

359 at much lower levels in *vit1-1* perivascular cell globoids as well as in the cytosol of both
 360 subepidermal and perivascular cells. Surprisingly, despite the similar pattern revealed by
 361 Perls/DAB staining in *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1*, the situation was different in the triple mutant:
 362 Fe was detected at similar low levels in globoids from subepidermal and perivascular cells
 363 (Figure 8, 9). Together with the results of Perls/DAB analysis indicating iron is concentrated
 364 in subepidermal cells, these data suggest that the subcellular of iron is modified in *nr3nr4vit1-*

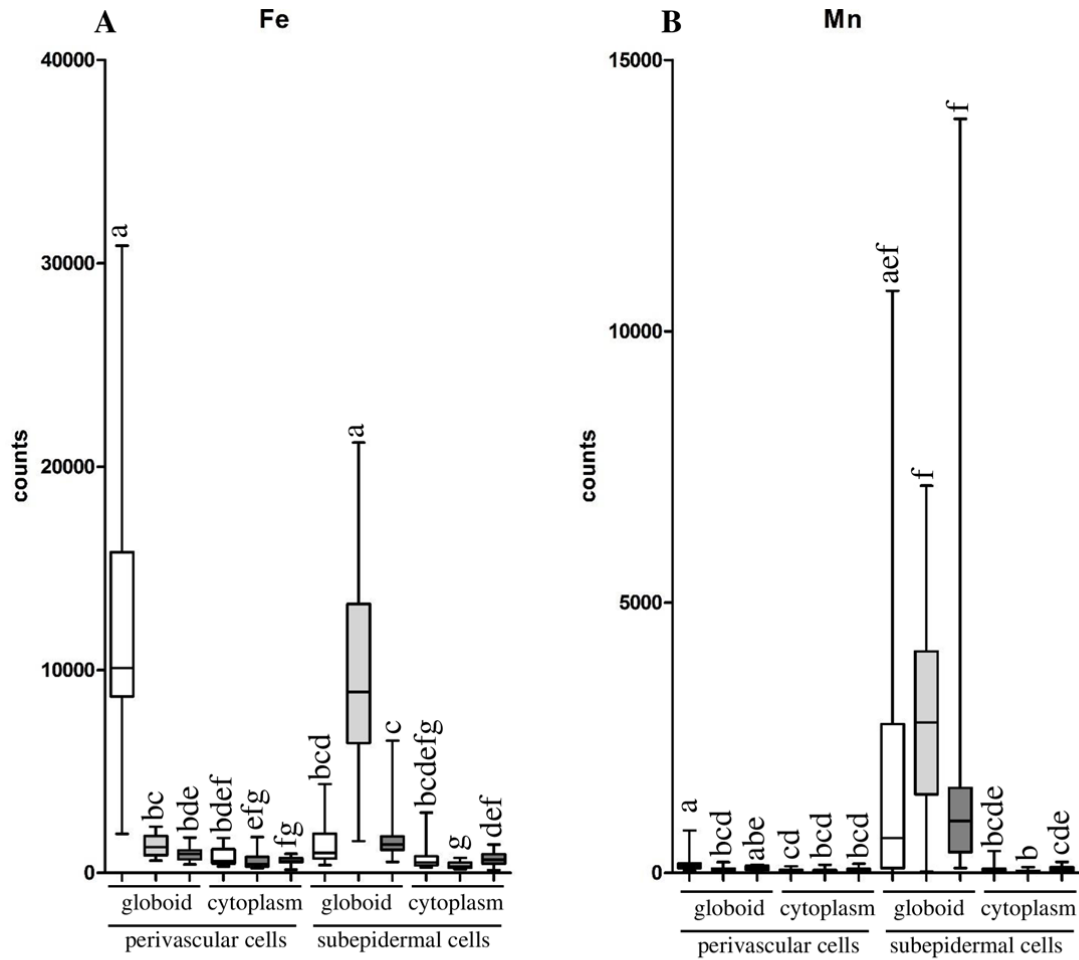


Figure 9 : EDS analysis does not detect high Fe concentrations in *nramp3nramp4vit1-1* globoids or cytoplasm from subepidermal cells. Spectra were obtained by TEM EDX in globoids or cytoplasm in perivascular or subepidermal cells of cotyledons. Boxplots show the integrated sum of net counts between 6.34 and 6.47 KeV for Fe (FeK α 6.4, A) and between 5.83 and 5.96 keV for Mn (MnK α 5.9, B). Nets counts were obtained by subtracting the background from the peaks. Data are presented as median, boxes show 25-75 percentile and whiskers show minimal and maximal values. White box: col-0, light grey: *vit1-1*, dark grey: *nramp3nramp4vit1-1*. Different letters denote statistically significant difference between samples based on a Kruskal Wallis test ($p < 0.001$) followed by a Tukey *post hoc* analysis with $p < 0.05$. However, TEM EDX did not detect any increase in Fe in the cytosol of subepidermal cells in *nr3nr4vit1-1* compared to *vit1-1* or wild type (Figure 9). Manganese distribution was not affected by the mutations. Manganese was concentrated in subepidermal cell globoids in all the genotypes analyzed (Figure 8, 9). Interestingly, Mn was not present in all subepidermal cells: in about one third of subepidermal cells, Mn was not detected in globoids. In contrast to Fe, Mn could not be detected in the cytosol, irrespective of the cell type analyzed (Figure 9).

372

373

Discussion

In this work, we screened an EMS mutagenized population of *nr3nr4* double mutant looking for mutations that suppress its chlorotic phenotype under Fe deficiency. We characterized two mutants in which loss of VIT1 function is responsible for the suppressor phenotype (Figure 4).

Novel mutations provide insights into AtVIT1 protein structure-function relationships

Two distinct mutations were discovered in the *VIT1* gene. In *isv1*, the *vit1-2* mutation led to an amino acid change: Gly77, a hydrophobic residue with no lateral chain was replaced by aspartic acid, a polar residue with a bulky lateral chain. Analysis of VIT1 amino acid sequence with ARAMEMNON software predicts 5 alpha helices forming transmembrane domains (Gollhofer et al., 2011)(Figure 6A). Gly77 would be localized in the middle of the second transmembrane domain. Moreover, sequence alignment reveals that this transmembrane domain, and specifically Gly77 is highly conserved in VIT1 homologues from a range of species (Supplemental data Figure 1). Previous studies have shown that $\Delta ccc1$ growth defect may be rescued by transformation with *AtVIT1* and its homologues *AtVTL1* (Gollhofer et al., 2014), *LeVIT1* (Kim et al., 2006), *TgVIT1* (Momonoi et al., 2009), *OsVIT1* or *OsVIT2* (Zhang et al., 2012). Expression in yeast indicates that the G77D mutation prevents $\Delta ccc1$ rescue by *AtVIT1* but does not alter *AtVIT1* protein level or subcellular localization (Figure 6). It is likely that Gly77 might play a critical role in VIT1 transport function or indirectly in VIT1 interactions with membrane lipids, others transmembrane domains or other proteins. Residues important for the function of VIT1 protein family proteins have already been identified (Hakoyama et al., 2012). LjSEN1, a VIT1 homologue is required for symbiotic nitrogen fixation by *L. japonicum*. Mutations A41V (*sen1-1*), R111K (*sen1-2*) and G191E (*sen1-5*) were shown to impair LjSEN1 function. However, whether these mutations affect LjSEN1 stability, localization or transport function was not investigated and none of these residues corresponds to Gly77 in LjSEN1 sequence (Supplemental Figure 1).

In *isv2*, the *vit1-3* mutation led to a change in the 3' splicing consensus sequence of the first intron (Figures 3 and 5). Two forms of RNA could be detected in *nr3nr4vit1-3*. In the first one, the first intron is unspliced and in the other one, the intron is mis-spliced; for this second RNA form, a cryptic acceptor site located 8 nucleotides downstream of the mutation in the second exon is used, which causes a frameshift (Figure 5). Both RNA forms introduce premature stop codons and are expected to produce nonfunctional proteins. This combination of a 3' shift in the first AG downstream form and unspliced form has already been described in the *cop1-11* mutant (McNellis et al., 1994).

VIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4 define a functional module for iron storage in endodermal cells.

Our study provides the first genetic evidence that AtVIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4 function in the same pathway by demonstrating epistatic relationship between *vit1* and *nr3nr4* mutations. In the WT embryo, about 50% of Fe stores is localized in endodermal cells, where AtVIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4 are expressed (Kim *et al.*, 2006, Lanquar *et al.*, 2005). Our TEM EDX data confirm that, in this cell type, the main site for iron storage is the vacuole. Furthermore the present work indicates that the AtVIT1/AtNRAMP3/AtNRAMP4 functional module is essential for iron storage in this specific cell type (Figure 8, 10). This module may be conserved in other species. In seeds of *Phaseolus* species, Fe is also concentrated around vascular tissues, similar to the situation encountered *Arabidopsis thaliana* seeds (Cvitanich *et al.*, 2010). In cereals, such as rice or wheat, a major part of seed Fe is stored in the aleurone layer (Johnson *et al.*, 2011) and Fe was found to be associated to globoids in this cell layer in wheat (Lott and Spitzer, 1980). The molecular players involved in loading and remobilization have not so far been identified in species other than *Arabidopsis thaliana*.

A range of phenotypes associated with the localization of Fe stores in embryos and their mobilization

The phenotypes observed on iron deficient medium may be ranked on the basis of their severity: WT>>*vit1-1*>*nr3nr4vit1-1* = *nr3nr4vit1-2* = *nr3nr4vit1-3* >>*nr3nr4*. In our conditions, WT seedlings are not chlorotic under Fe deficient conditions, at least not during the first week after germination (Figure 1). This indicates that seed Fe stores are sufficient for the initial stages of development. At the other end, *nr3nr4* seedlings are highly chlorotic and their development is fully arrested under iron deficiency (Figure 1). This confirms that retrieval of vacuolar Fe stores is essential for seedling development (Lanquar *et al.*, 2005). As previously described (Kim *et al.*, 2006), *vit1* seedlings were also chlorotic when germinated under iron deficiency (Figures 1). However this phenotype was clearly milder than that of the *nr3nr4* double mutant: despite the chlorosis, *vit1-1* mutant roots reach the same size as the WT after 2 weeks (Figure 1C). Our results indicate that Fe is readily mobilized from cotyledon subepidermal cells and root cortical cells in *vit1-1* (Figure 7, 10). Therefore, the *vit1* phenotype did not results from a defect in Fe mobilization but rather from Fe being released at the wrong location.

Interestingly, *nr3nr4vit1-2* (*isv1*), *nr3nr4vit1-3* (*isv2*) and *nr3nr4vit1-1* triple knockout displayed a phenotype intermediate between *vit1-1* and *nr3nr4*. Importantly, seedlings of

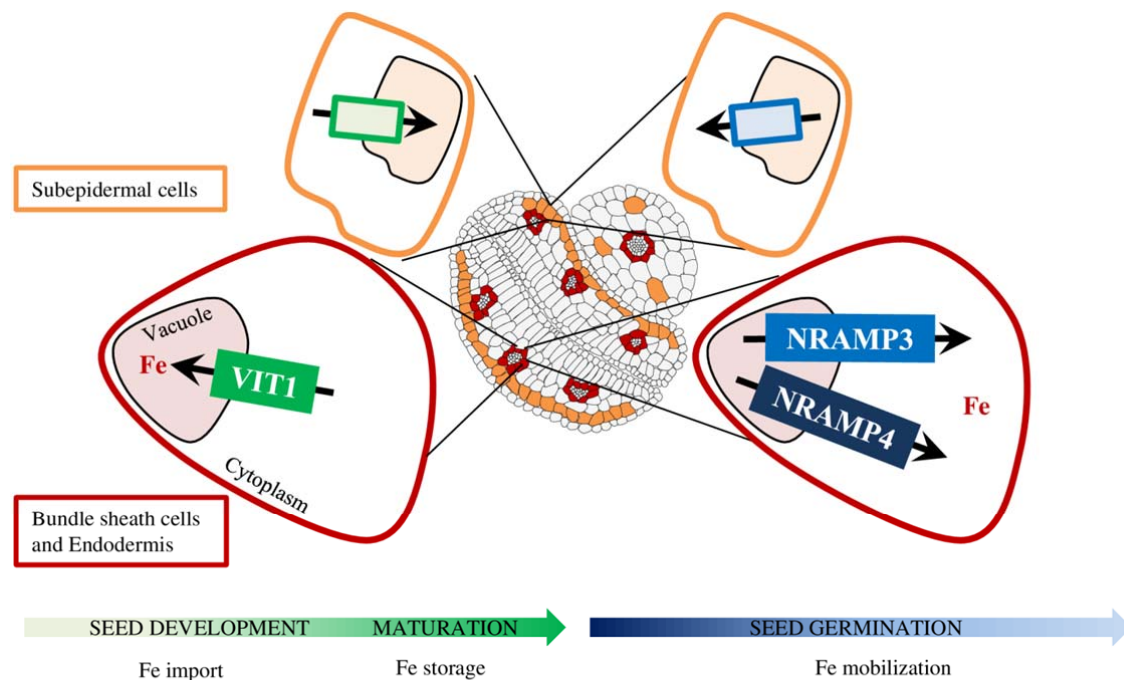


Figure 10 : Working model for VIT1 and NRAMP3/NRAMP4 during seed development, maturation and germination in *Arabidopsis thaliana* embryo (transversal section). Bundle sheath and endodermal cells are highlighted in red. Subepidermal cells are highlighted in orange. Vacuolar iron transporters are represented as green or blue boxes.

these mutants contained detectable levels of chlorophyll and their root elongated, which is not the case for *nr3nr4* double mutant. Moreover, their Fe stores were mobilized from cotyledon subepidermal cells and root cortical cells as efficiently as in the *vit1-1* single mutant (Figure 7). This indicates that these cell types mobilize Fe independently of AtNRAMP3 and AtNRAMP4 (Figure 10).

The origin of the difference between the phenotypes of *vit1-1* single mutant and *nr3nr4vit1-1* triple mutant might reside in the remobilization of the low concentration Fe pool that is not visualized by Perls/DAB staining. Schnell Ramos *et al.* (2013) have reported that only 50% of Fe in the embryo is located in the highly concentrated areas, endodermis in wild type or cotyledon subepidermal cells in *vit1-1* and Fe is present at lower concentrations in all embryo cell types. Whereas AtVIT1 expression is restricted to the vasculature (Kim *et al.*, 2006), AtNRAMP3 and AtNRAMP4 expression patterns extend to whole cotyledons (Lanquar *et al.*, 2005). Inability to remobilize the low concentration iron pool in *nr3nr4vit1-2* (*isv1*), *nr3nr4vit1-3* (*isv2*) and *nr3nr4vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* mutants may account for their more

severe phenotypes compared to *vit1-1* single mutant. High resolution techniques will be needed to monitor Fe localization and speciation in dry seeds and during germination to solve this issue.

Is storage in vacuolar globoids bypassed in nramp3nramp4vit1-1 cotyledons?

Here, with TEM-EDX imaging we conclusively identified the site of iron storage within cotyledon subepidermal cells and root cortical cells in *vit1-1* as vacuolar globoids. However, there was a discrepancy between the iron pattern revealed by Perls/DAB staining and the TEM EDX data for the *nr3nr4vit1-1* triple mutant (Figure 2, 8, 9). The pattern revealed by Perls/DAB staining mimicked that of *vit1-1* mutant. In contrast, TEM EDX detected similar Fe levels in perivascular and subepidermal cells in the triple mutant (Figure 8, 9). This suggests that part of the Fe visualized by Perls/DAB is not associated to vacuolar globoids. This Fe pool may be localized in a different compartment that is either too diffuse for detection by TEM-EDX or is washed out during the preparation of section for this technique. The more severe phenotype observed in *nr3nr4vit1-1* compared to *vit1-1* during germination might be due to differences in Fe subcellular localization and/or speciation in subepidermal cells in these two mutants (Figure 8, 9). In any case, the TEM EDX data suggest that Fe subcellular localization and/or speciation is distinct in *vit1-1* and *nramp3nramp4vit1-1*. Determining the identity of the Fe pool in *nr3nr4vit1-1* subepidermal cells will be a challenge for future studies. The difference between *vit1-1* and *nramp3nramp4vit1-1* observed in dry seeds indicates that AtNRAMP3 and AtNRAMP4 in Fe transport not only during germination but also during embryogenesis.

Conclusion

The results reported in this manuscript genetically demonstrate the functional link between AtVIT1, AtNRAMP3 and AtNRAMP4. These three genes define a functional module active in cells that surround the vasculature in the embryo. The function of this module is essential for optimal seedling establishment under Fe deficient conditions. Moreover, our data allow a functional dissection of the different Fe pools present in the *Arabidopsis* embryo and determine their relevance for germination in environments where Fe is poorly available.

Supplementary online material

Supplemental table I: **Metal concentrations in seeds measured by Atomic Absorption Spectrometry.**

Supplemental figure 1: **Protein alignment of VIT1 homologues**

Aknowledgements

The authors are grateful to Thiên-Du CHABERT for help with the yeast experiments. This work has also benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBiSA), the French National Research Agency under Investments for the Future programs “France-BioImaging infrastructure” (ANR-10-INSB-04-01), “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS), and the Conseil Général de l'Essonne.

Literature

- Bouis HE** (2003) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost? *Proc Nutr Soc* **62**: 403-411
- Bruch EM, Thomine S, Tabares LC, Un S** (2015) Variations in Mn(II) speciation among organisms: what makes *D. radiodurans* different. *Metallomics* **7**: 136-144
- Clemens S** (2014) Zn and Fe biofortification: the right chemical environment for human bioavailability. *Plant Sci* **225**: 52-57
- Cvitanich C, Przybylowicz WJ, Urbanski DF, Jurkiewicz AM, Mesjasz-Przybylowicz J, Blair MW, Astudillo C, Jensen EO, Stougaard J** (2010) Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in *Phaseolus* seeds. *BMC Plant Biol* **10**: 26
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Finazzi D, Arosio P** (2014) Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol* **88**: 1787-1802
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425
- Gollhofer J, Schlawicke C, Jungnick N, Schmidt W, Buckhout TJ** (2011) Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **49**: 557-564
- Gollhofer J, Timofeev R, Lan P, Schmidt W, Buckhout TJ** (2014) Vacuolar-Iron-Transporter1-Like proteins mediate iron homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS One* **9**: e110468
- Haber F, Weiss J** (1932) On the catalysis of hyperoxide. *Naturwissenschaften* **20**: 948-950
- Hakoyama T, Niimi K, Yamamoto T, Isobe S, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Kumagai H, Umehara Y, Brossuleit K, Petersen TR, Sandal N, Stougaard J, Udvardi MK, Tamaoki M, Kawaguchi M, Kouchi H, Suganuma N** (2012) The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol* **53**: 225-236
- Halliwell B** (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett* **92**: 321-326
- Johnson AA, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E, Tester M** (2011) Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One* **6**: e24476
- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML** (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* **314**: 1295-1298
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**: 4041-4051

- Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J** (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* **276**: 29515-29519
- Lott JN, Spitzer E** (1980) X-ray Analysis Studies of Elements Stored in Protein Body Globoid Crystals of Triticum Grains. *Plant Physiol* **66**: 494-499
- McNellis TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Misera S, Deng XW** (1994) Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* **6**: 487-500
- Molins H, Michelet L, Lanquar V, Agorio A, Giraudat J, Roach T, Krieger-Liszkay A, Thomine S** (2012) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ*
- Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, Nitta A, Nishimura M** (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J* **59**: 437-447
- Otegui MS, Capp R, Staehelin LA** (2002) Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **14**: 1311-1327
- Porra R, Thompson W, Kriedemann P** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll II standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394
- Punshon T, Hirschi K, Yang J, Lanzirrotti A, Lai B, Guerinot ML** (2012) The role of CAX1 and CAX3 in elemental distribution and abundance in Arabidopsis seed. *Plant Physiol* **158**: 352-362
- Ravet K, Touraine B, Kim SA, Cellier F, Thomine S, Guerinot ML, Briat JF, Gaymard F** (2009) Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular iron trafficking during fruit development in Arabidopsis. *Mol Plant* **2**: 1095-1106
- Roschzttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S** (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol* **151**: 1329-1338
- Schnell Ramos M, Khodja H, Mary V, Thomine S** (2013) Using muPIXE for quantitative mapping of metal concentration in Arabidopsis thaliana seeds. *Front Plant Sci* **4**: 168
- Zhang Y, Xu YH, Yi HY, Gong JM** (2012) Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J* **72**: 400-410

Figure Legends

Figure 1: *isv1* (*nr3nr4vit1-2*), *isv2* (*nr3nr4vit1-3*) and *nr3nr4vit1-1* suppress chlorosis and developmental arrest phenotypes of *nr3nr4* on low iron medium after germination. A, 5 day-old grown in ABIS medium without iron (- Fe +50 μ M Ferrozine) or with iron (+ 50 μ M Fe) seedlings of WT (Col0), *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* candidates. Scale bar: 1 mm. B, Total chlorophyll content. C, Primary root length of 12 day-old grown in ABIS medium without iron (- Fe) or with iron (+ 50 μ M Fe) seedlings of WT (Col0), *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* candidates.

Figure 2: *isv1* (*nr3nr4vit1-2*), *isv2* (*nr3nr4vit1-3*), *nr3nr4vit1-1* and *vit1-1* single T-DNA mutant display similar iron distribution patterns in embryos. Perls/DAB staining of embryos from Col0, *nr3nr4*, *vit1-1*, *nr3nr4vit1-1*, *isv1* and *isv2* mature seeds.

Figure 3: *isv1* and *isv2* carry mutations in the *VIT1* gene. Position of *isv1* and *isv2* mutations and T-DNA insertion of the *vit1-1* mutant on the *VIT1* genomic DNA sequence (black bars stand for exons, black lines for introns and mutations are indicated in red).

Figure 4: The suppressor phenotype of *isv1* (*nr3nr4vit1-2*), *isv2* (*nr3nr4vit1-3*) candidates is caused by the mutations in *VIT1*. Four day-old seedlings grown in ABIS medium without iron (- Fe +50 μ M Ferrozine) of WT, *nr3nr4* and F1 from crosses between *nr3nr4vit1-1* and *isv1*, *nr3nr4vit1-1* and *isv2* or between the 2 candidates.

Figure 5: Effects of *vit1-2* and *vit1-3* mutations on *VIT1* mRNA structure. RT-PCR on cDNA from siliques of *nr3nr4*, *nr3nr4vit1-1*, *nr3nr4vit1-2* and *nr3nr4vit1-3*. Four different types of amplicons have been detected and sequenced: (a) residual genomic DNA or unspliced RNA, (b) mature mRNA, (c) mRNA with unspliced first intron and, (d) mis-spliced mRNA missing 8 nucleotides at the beginning of second exon.

Figure 6: The *VIT1* G77D transporter encoded by the *vit1-2* allele does not rescue the $\Delta ccc1$ yeast mutant.

A, Predicted topology of the *VIT1* transporter. Localization of Glycine 77 in the middle of the second transmembrane domain. B, Yeast drop test. AtVIT1, AtVIT1^{G77D} and the corresponding GFP fusion proteins were expressed in $\Delta ccc1$ mutant. The complementation was scored by spotting serial dilutions of yeast cultures on selective medium (SD -Ura)

615 supplemented or not with 5 mM or 10 mM of FeSO₄. WT strain (DY150) and $\Delta ccc1$ mutant
616 transformed with an empty vector are used as controls. C, Immunoblot with antibody against
617 VIT1 on protein extracts from strains used for the drop test. As the time for detection of GFP
618 fusion protein is longer than for the native version, two exposures are shown: At the top, blot
619 exposed 7 min and at the bottom, blot exposed 30 sec.

620 D, Localization of the GFP fluorescence signal in $\Delta ccc1$ yeast mutant cells transformed with
621 the WT or G77D version of VIT1-GFP by confocal microscopy.

622
623 **Figure 7: Iron stores are efficiently remobilized during *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* mutant**
624 **seedling development.** Seedling development and iron localization were monitored in
625 parallel during the 7 first days after sowing. For each panel, at the top, pictures of seedlings
626 on low iron medium (ABIS – Fe + 50 μ M Fz) and at the bottom, Perls/DAB staining of Col0,
627 *nr3nr4*, *vit1-1* and *nr3nr4vit1-1* (from left to right) 1, 4 or 7 days after transfer to the growth
628 chamber. Scale bar: day 1 = 100 μ m, day 4 = 1 mm, day 7 = 1 mm.

629
630
631 **Figure 8: Less Fe is associated to vacuolar globoids of subepidermal cells in the**
632 ***nramp3nramp4vit1-1* than in the *vit1-1* mutant.** Analysis of Fe and Mn content in vacuolar
633 globoids in embryo from dry seeds using TEM-EDX. A, TEM micrograph of a 500 nm thick
634 transverse section through a cotyledon. B, schematic representation of the section. EN,
635 endodermal/bundle sheath cell (red). SE, subepidermal cell (orange). C-H representative
636 spectra at the energies of Mn and Fe emissions with beam focused on globoids from bundle
637 sheath cells (C, E, G) or subepidermal cells (D, F, H) in wild type (C, D), *vit1-1* (E, F) or
638 *nr3nr4vit1-1* (G, H).

639
640 **Figure 9: EDS analysis does not detect high Fe concentrations in *nramp3nramp4vit1-1***
641 **globoids or cytoplasm from subepidermal cells.** Spectra were obtained by TEM EDX in
642 globoids or cytoplasm in perivascular or subepidermal cells of cotyledons. Boxplots show the
643 integrated sum of net counts between 6.34 and 6.47 KeV for Fe (FeK α 6.4, A) and between
644 5.83 and 5.96 keV for Mn (MnK α 5.9, B). Nets counts were obtained by subtracting the
645 background from the peaks. Data are presented as median, boxes show 25-75 percentile and
646 whiskers show minimal and maximal values. White box: col-0, light grey: *vit1-1*, dark grey:
647 *nr3nr4vit1-1*. Different letters denote statistically significant difference between samples
648 based on a Kruskal Wallis test ($p < 0.001$) followed by a Tukey *post hoc* analysis with $p <$

0.05.

Figure 10: Working model for VIT1 and NRAMP3/NRAMP4 during seed development, maturation and germination in *Arabidopsis thaliana* embryo (transversal section). Bundle sheath and endodermal cells are highlighted in red. Subepidermal cells are highlighted in orange. Vacuolar iron transporters are represented as green or blue boxes.

	Ca		Fe		Mg		Mn		Zn	
Col0	4200±	208	78±	5	3192±	79	32±	4	58±	5
<i>nr3nr4</i>	4590±	288	73±	1	3247±	106	34±	3	59±	7
<i>vit1-1</i>	4445±	329	80±	13	3373±	87	33±	3	62±	5
<i>nr3nr4vit1-1</i>	4546±	176	65±	2	3153±	125	32±	1	67±	14

Supplemental table I: Metal concentrations in seeds (mg.kg⁻¹ DW) measured by Atomic Absorption Spectrometry.

			20		40		60
ScCCC1p	MSIVALKNAV	VTLIQKAKGS	GGTSELGGSE	STPLLRGSNS	NSSRHDNLSS	SSSDIIYGRN	60
AtVIT1	M-----	-----	--SSEEDKIT	RISIEPEKQT	LLDHHTEKHF	TAGE-----	33
OsVIT1.1	MAA-----	-----	-ATDG--GGL	PLLADKAASH	SHHHHPERHF	TSGE-----	34
OsVIT1.2	MVK-----	-----E	FVQDE--EKQ	RLLLDE----	----HTEKHF	TAGE-----	28
TgVIT1	MVI-----	-----A	GVSPPTPSSE	NLLQE-----	----HEEKHF	TATD-----	29
LjSEN1	MAAGAP----	-----N	HVGTIPNPAN	GTTDQ-----	-----NKQT	QVTDVPRVVD	36
GmNODULIN-21	MVVVSPKMAN	ATPNGSVPHN	HVGAVLLTIP	TIKID-----	-----GKQT	LATEDHTSID	49
		80		100		120	
ScCCC1p	SAQDLENSPM	SVGKDNRNGD	NGSDNEKANL	GFFQSVDPRV	ISDLIIIGLSD	GLTVPFALTA	120
AtVIT1	-----	-----	-----	-----I	VRDIIIGVSD	GLTVPFALAA	54
OsVIT1.1	-----	-----	-----	-----V	VRDVIMGVSD	GLTVPFALAA	55
OsVIT1.2	-----	-----	-----	-----V	VRDIIIGVSD	GLTVPFALAA	49
TgVIT1	-----	-----	-----	-----V	VRDVIIGVSD	GLTVPFALAA	50
LjSEN1	YWQR A QW----	-----	-----	-----	LRAAVLGAND	GLVSVASLMM	63
GmNODULIN-21	YLQRAQW----	-----	-----	-----	LRAAILGAND	GLVSVASLMM	76
		140		160		180	
ScCCC1p	GLSSLG-DAK	LVITGGFAEL	IS G AISMGLG	GYLGAKSESD	YYHAEVKKEK	RKFYDNSNLI	179
AtVIT1	GLSGANASSS	IVLTAGIAEV	A A GAISMGLG	GYLAAKSEED	HYAREMKREQ	EEIVAVPETE	114
OsVIT1.1	GLSGASAPSS	LVLTAGLAEV	A A GAISMGLG	GYLAAKSEAD	HYQREMKREQ	EEIIAVPDTE	115
OsVIT1.2	GLSGANAPSA	LVLTAGLAEV	A A GAISMGLG	GYLAAKSDAD	HYHRELQREQ	EEIDTVPDTE	109
TgVIT1	GLSGANVPSS	LILTAGIAEV	A A GAISMGLG	GYLAAKSEED	HYMRELKREQ	EEIINVPDVE	110
LjSEN1	GVGAVNKDAK	AMLLAGFAGL	V A GACGMAIG	EFVSVFTQYE	VEVGQMK R D-	-----	112
GmNODULIN-21	GVGAVKRDAK	AMLLAGFAGL	V A GACGMAIG	EFVAVYTQYE	VEVGQMKRD-	-----	125
		200		220		240	
ScCCC1p	NREIEDILLE	INPNFSDETI	VSFIKDLQRT	PELMVDFIIR	YGRGLDEPAE	NRELISAVTI	239
AtVIT1	AAEVAEILAQ	YG--IEPHEY	SPVVNALRKN	PQAWLDFMMR	FELGLEKPDP	KRALQSAFTI	172
OsVIT1.1	AAEIGEIMSQ	YG--LEPHEY	GPVVDGLRRN	PQAWLDFMMR	FELGLEKPDP	KRAIQSALTI	173
OsVIT1.2	AAEIIADILSQ	YG--LGPEEY	GPVVNSLRSN	PKAWLEFMMK	FELGLEKPEP	RRALMSAGTI	167
TgVIT1	AAEIGEILAQ	YG--LEPHVY	NPVVNSLRKN	PQAWLDFMMK	FELGLEKPEP	RRALESAMTI	168
LjSEN1	-----	-----	-----MIKS	EQGERDLEMA	MEKRKSIPNP	---MQAALAS	143
GmNODULIN-21	-----	-----	-----MNMS	VGGERDLEME	MERR-TLPNP	---LQATLAS	155
		260		280		300	
ScCCC1p	GGGYLLGGLV	PLVPYFFVSD	VGTGLIYSII	VMVVTLFWFG	YVKTKLSMGS	GSSTSKKVTE	299
AtVIT1	AIAYVLGGFI	PLLPYMLIPH	AMDAAVASVV	ITLFALEIFG	YAKGHFT---	---GSKPLRS	226
OsVIT1.1	ALSYVIGGLV	PLLPYMFIST	AQNAMLTSGV	VTLVALLFFG	YIKGRFT---	---GNRPFLS	227
OsVIT1.2	ALAYVVGGLV	PLLPYMFVPT	ADRAMATSVV	VTLAALLFFG	YVKGRFT---	---GNRPFIS	221
TgVIT1	ALAYVVGGLV	PLSPYFFIPF	AKQAMITSIA	VTLLALVVFG	YIKGRFT---	---GSPVLS	222
LjSEN1	AFSFSIGGLV	PLLSGSFVSV	YKIRLLVIVV	VVSLALVAFG	SVGSLL----	--- G KTPMTR	196
GmNODULIN-21	ALCFSIGALV	PLLSAAFIEN	YRTRIIVVVA	MSCLALVVFG	WVGAKL----	---GKTPK--	206
		320					
ScCCC1p	GVEMVVVGG-	VAAGAAWFFV	KLLG-----				322
AtVIT1	AFETAFIGA-	IASAAAFCLA	KVVQH-----				250
OsVIT1.1	AVQTAIIIGA-	LASAAAYGMA	KAVQT-----R				252
OsVIT1.2	AVQTAIIIGA-	LASAAAFGMA	KAVQS-----I				246
TgVIT1	SIQTAIIIGA-	LASAAAYAMA	KAVQS-----V				247
LjSEN1	SCVRFMIGGW	MAMAITFGLT	KLLSAGGLEI				226
GmNODULIN-21	-----	-----	-----				206

Supplemental figure 1: Protein alignment of VIT1 homologues from yeast (ScCCC1c), Arabidopsis (AtVIT1), rice (OsVIT1.1 and OsVIT1.2), tulipa (TgVIT1), *Lotus japonicus* (LjSEN1) and soybean/*Glycine max* (GmNODULIN-21). Red box: G77 conserved residue mutated in *isvI*. Purple boxes: residues mutated in *sen* mutants of *Lotus japonicus* A41, R111 and G191.

CONCLUSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES

1. Conclusion, apports du travail de thèse

Cette thèse a porté sur la recherche des mutations supprimeurs du phénotype du double mutant *nramp3nramp4* lors de sa germination sur milieu carencé en fer. Cette approche a été mise en place pour identifier de nouveaux acteurs moléculaires contrôlant le stockage et la disponibilité du fer dans la graine.

La découverte de deux allèles mutants dans le gène *VIT1* a permis de valider cette stratégie : le crible a isolé des mutants dans le gène codant un transporteur déjà connu pour jouer un rôle dans le stockage du fer dans la graine.

À l'heure actuelle, en plus des mutants *isv1* et *isv2* caractérisés de manière approfondie et présentés dans le chapitre 2, sept candidats sont prêts à être étudiés à court terme : pour chacun d'eux, le phénotype supprimeur a été vérifié à la génération M3, les rétrocroisements ont été réalisés, le génotype double mutant *nramp3nramp4* des plantes F1 a été vérifié et la ségrégation du phénotype peut être analysée en utilisant les graines de génération F2 disponibles. La ségrégation sera vérifiée sur milieu carencé en fer afin de déterminer le caractère dominant ou récessif de la mutation. S'il s'avère que la mutation responsable du caractère supprimeur est récessive, des plantes montrant un phénotype supprimeur de cette génération pourront être utilisées pour séquençage haut-débit dans les prochains mois.

À ces candidats s'ajoutent les mutants *isv3* et *isv4* dont l'étude est à reprendre au niveau des M3 puisque l'analyse des croisements antérieurs a révélé des contaminations par des allèles sauvages d'*AtNRAMP3* ou d'*AtNRAMP4*. Ces deux mutants présentent des intérêts spécifiques justifiant la reprise de leur étude : *isv3* dont la répartition du fer dans la graine ressemble à celui de *vit1-1* sans que le gène *VIT1* ne soit affecté, pourrait donner des informations sur la régulation de *VIT1* ; d'autre part, *isv4* est le mutant qui présente le phénotype supprimeur le plus prononcé parmi tous les candidats obtenus.

2. Perspectives sur la caractérisation de VIT1

2.1. Fonction de la protéine VIT1

L'identification du locus suppresseur des mutants *isv1* et *isv2* a été permise par la détermination du patron de distribution du fer à l'aide de la coloration au Perls/DAB. Deux nouveaux allèles mutants dans le gène *VIT1* ont ainsi été mis en évidence.

La mutation *vit1-2* met en lumière l'importance de la glycine 77 pour la fonction du transporteur. Ce résidu glycine s'avère conservé dans le règne végétal et chez l'orthologue de *Saccharomyces cerevisiae* CCC1.

Alors qu'elle est exprimée à un niveau cellulaire équivalent à la version native et que sa localisation n'est pas affectée, l'incapacité de la version G77D de VIT1 à compléter la souche mutante $\Delta ccc1$ indique que la G77 est essentielle pour la fonction de transport. Les analyses *in silico* prédisent que la protéine VIT1 contient seulement 5 domaines transmembranaires. La plupart des transporteurs de métaux connus à ce jour comportent 8 à 12 domaines transmembranaires [ZIP (Guerinot, 2000), HMA (Heavy Metal P-type ATPase) (Argüello *et al.*, 2007), NRAMP (Ehrnstorfer *et al.*, 2014)]. CTR1 (Copper Transporter 1) et ses homologues qui ne comportent que 3 domaines transmembranaires constituent une exception mais il a été montré qu'ils fonctionnent sous la forme de trimères (De Feo *et al.*, 2009). Nous proposons que le transporteur VIT1 et ses homologues pourraient aussi fonctionner sous forme de multimères. Cette hypothèse pourrait notamment rendre compte de l'observation que VIT1-GFP complète plus efficacement la souche mutante $\Delta ccc1$ que la version native. On sait en effet que la GFP tend à former des dimères (Phillips, 1997). Elle pourrait donc stabiliser des multimères fonctionnels de VIT1. Dans cette hypothèse, la glycine 77 au cœur du deuxième domaine transmembranaire pourrait être impliquée dans l'interaction entre les sous-unités. Pour tester cette possibilité, il serait possible d'utiliser les techniques de « split ubiquitine » en levures ou de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) en cellules végétales. Si l'hypothèse est juste, ces approches devraient révéler les interactions, entre VIT1 et lui-même, qui pourraient être abolies chez le mutant G77D. Si VIT1 fonctionne sous forme multimérique, on s'attend par ailleurs à ce que, *in planta*, la protéine VIT1 G77D ait un effet « dominant négatif » en perturbant l'assemblage ou la fonction des multimères de VIT1, comme c'est le cas pour les sous-unités mutantes de canaux potassiques qui fonctionnent sous forme de tétramères (Ranganathan *et al.*, 1996). Si l'hypothèse est juste, on devrait observer un phénotype *vit1* partiel chez les hétérozygotes *VIT1/vit1-2*. En effet, si

VIT1 fonctionne sous forme de dimère et que les sous-unités sauvage et mutante sont produites en quantité égale, on ne s'attend à obtenir qu'un quart de dimères fonctionnels. Il sera donc au préalable important de vérifier que la protéine VIT1 G77D est produite chez le mutant *isv1* au même niveau que chez le type sauvage en réalisant des expériences d'immuno-détection grâce à l'anticorps anti-VIT1 disponible. Cependant, les essais menés jusqu'à maintenant n'ont pas permis de détecter la protéine VIT1 dans un extrait de protéines de siliques de type sauvage. Suivant le même raisonnement, on devrait pouvoir générer un phénotype *vit1* en surexprimant *vit1-2* chez le type sauvage.

2.2. Régulation de VIT1

Le candidat *isv3* présente, comme *isv1* et *isv2*, une modification du patron de distribution du fer dans l'embryon semblable à celle observée chez le mutant *vit1-1*. Cependant, chez *isv3*, aucune mutation n'a été détectée dans la séquence codante de VIT1. Le mutant *isv3* représente donc vraisemblablement un excellent outil pour aborder l'étude de la régulation de VIT1. Plusieurs pistes pourraient expliquer que ce mutant mime une perte de fonction dans VIT1. Il se peut qu'une mutation dans le promoteur de VIT1 affecte la liaison d'un facteur de transcription nécessaire à l'expression de VIT1. La mutation *isv3* pourrait aussi affecter le locus VIT1 au niveau épigénétique, en influençant, par exemple, la méthylation de son promoteur. Pour tester ces possibilités, on pourra mesurer le niveau de transcrits de VIT1 et séquencer le promoteur de VIT1 en utilisant éventuellement une technique sensible à la méthylation. Ce n'est pas la seule hypothèse : la mutation *isv3* pourrait affecter la stabilité ou la localisation de la protéine VIT1. Pour tester ces dernières hypothèses, on pourra utiliser l'anticorps anti-VIT1 disponible pour réaliser des expériences d'immuno-détection et d'immuno-localisation de VIT1. On pourra également tester l'effet de la mutation *isv3* sur la localisation de VIT1 en introduisant dans le mutant *isv3* une version VIT1 fusionnée à la GFP. Toutes ces hypothèses sont captivantes mais il faudra, dans un premier temps, confirmer le génotype double mutant *nramp3nramp4* du candidat *isv3*.

2.3. Signification fonctionnelle du patron de répartition dans l'embryon

Grâce aux mutants *isv1*, *isv2* et au triple mutant *nramp3-2nramp4-2vit1-1*, nous avons démontré la relation épistatique existant entre les trois gènes codant les transporteurs AtVIT1, AtNRAMP3 et AtNRAMP4. Ces trois protéines constituent un module fonctionnel responsable du stockage et de la mobilisation du fer vacuolaire autour des tissus vasculaires de l'embryon lors de son développement puis à sa germination. Les différents triples mutants

nramp3nramp4vit1 et le simple mutant *vit1-1* sont capables de se développer sur milieu carencé en fer malgré la perturbation de la distribution du fer dans leur embryon. Cependant, ils synthétisent très peu de chlorophylle par rapport au type sauvage. Nous avons vérifié que les contenus en fer des graines matures du triple mutant knockout *nramp3-2nramp4-2vit1-1* et du mutant *vit1-1* ne sont pas modifiés par rapport au type sauvage. Il serait important de le vérifier également pour les graines des mutants *isv1* et *isv2*. Ces observations posent la question de la signification fonctionnelle de la localisation du fer autour des tissus vasculaires. Le fer stocké dans les cellules sous épidermiques peut être mobilisé lors de la germination mais ce lieu de stockage ne permet pas une mise en place optimale de l'appareil photosynthétique lors des étapes précoces du développement.

Il serait intéressant de compléter la caractérisation des mutants *isv1* et *isv2* par des expériences de complémentation fonctionnelle par transgénèse. Au cours de cette thèse, des plantes *isv1* et *isv2* ont effectivement été transformées avec des constructions exprimant l'ADNc de *VIT1* fusionné ou non à la GFP sous le contrôle du promoteur fort et constitutif *CaMV 35S*. Nous avons observé une réversion du phénotype en T2 : les plantes transformées présentaient un phénotype sensible à la carence en fer semblable à celui du double mutant *nramp3nramp4*. Cependant, ce phénotype n'est pas maintenu dans la génération T3, sans doute à cause du phénomène d'extinction de transgène. C'est pourquoi les résultats ne sont pas présentés. Afin d'éviter ce phénomène, une nouvelle construction devrait être créée en utilisant le promoteur *VIT1* endogène au lieu du *35S*. Néanmoins, les plantes transgéniques de la génération T2 ont apporté des informations intéressantes : en effet, l'expression de *VIT1* restaure le phénotype d'arrêt de croissance *nramp3nramp4* sur milieu pauvre en fer sans restaurer le patron de distribution du fer de *nramp3nramp4*. Les plantes complémentées dissocient donc la localisation des réserves en fer et la capacité de l'embryon à les utiliser.

La perturbation de la localisation du fer dans l'embryon rencontrée chez le simple mutant *vit1* et les différents triples mutants soulève la question de l'identité des transporteurs impliqués dans le stockage et la mobilisation du fer vacuolaire dans les cellules sous épidermiques des cotylédons. Pour entreprendre la recherche des transporteurs impliqués dans la mobilisation du fer stocké dans les cellules sous épidermiques, une approche génétique possible serait la recherche de mutants amplifiant le phénotype de *vit1-1*. Une autre approche pourrait consister à tester des gènes candidats. Le choix des gènes candidats peut être réalisé suivant plusieurs critères. Comme on sait que les cellules sous épidermiques sont le lieu de stockage du manganèse dans la graine et que le Mn et le Fe peuvent souvent être transportés

par les mêmes systèmes, les gènes codant des transporteurs de Mn exprimés dans la graine représentent de bons candidats. Il serait également possible de croiser *in silico* les données disponibles d'expression au cours de l'embryogénèse, au stade graine mature et au début de la germination, avec la liste des protéines vacuolaires pour lesquelles une fonction de transport de métaux est prédite. La disponibilité de données transcriptomiques spécifiques des différentes couches cellulaires de l'embryon mature d'*Arabidopsis*, qui pourrait être obtenue par ablation laser par exemple, augmenterait grandement la spécificité de cette approche. Pour analyser le rôle des gènes candidats dans le transport du fer, les mutants de ces gènes devront être étudiés dans le fond mutant *vit1-1*.

3. Perspectives ouvertes par les autres candidats

Au-delà de l'étude de VIT1 et de sa régulation, les autres candidats sélectionnés ouvrent potentiellement de nouvelles pistes de recherche. La détermination de la mutation responsable du phénotype suppresseur chez ces candidats pourra être obtenue par séquençage haut-débit de populations F2 issues de rétrocroisements. Ces candidats présentent soit un patron de distribution du fer dans l'embryon semblable à celui du sauvage, soit une absence de coloration Perls/DAB du fer dans l'embryon.

Cette deuxième catégorie est particulièrement intrigante. Comment des embryons apparemment dépourvus de fer peuvent-ils se développer sur un milieu pauvre en fer ? La possibilité la plus triviale est qu'une modification de la cuticule entourant l'embryon empêche la pénétration des colorants dans l'embryon. Une autre possibilité est que ces embryons contiennent du fer mais sous une forme qui n'est pas colorable par le Perls/DAB. C'est le cas par exemple du fer hémique (Meguro *et al.*, 2007). Pour tester ces hypothèses, plusieurs approches sont possibles : on pourra, dans un premier temps, mesurer la concentration en fer dans les graines de ces mutants pour voir si elle est plus faible que chez le type sauvage. Dans un second temps, on pourra localiser le fer par d'autres approches qui ne sont pas sensibles à la spéciation : le μ PIXE (micro Particule Induced X-ray Emission) et la sXRF (synchrotron radiation induces X-Ray Fluorescence) (Ramos *et al.*, 2013, Cvitanich *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2006). S'il s'avère que ces embryons non colorés par le Perls/DAB contiennent effectivement du fer, il serait intéressant de déterminer sa spéciation, en utilisant par exemple la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS). Une troisième possibilité est que le fer ne pénètre pas dans l'embryon mais qu'il reste localisé dans les téguments ou dans l'albumen résiduel de la graine. L'observation de la coloration Perls/DAB dans les résidus extérieurs à

l'embryon chez certains mutants dont l'embryon n'est pas marqué par le Perls/DAB est en faveur de cette hypothèse. Dans ce cas, ces mutants pourraient apporter des informations sur les mécanismes d'absorption du fer par l'embryon. À l'inverse, les connaissances récentes acquises sur ce mécanisme pourront aider à l'analyse de ces mutants : on sait que le fer est apporté à l'embryon sous la forme de Fe(III)-citrate, que le transporteur AtFRD3 joue un rôle dans la fourniture du citrate dans le milieu entourant l'embryon et enfin que la sécrétion d'ascorbate par l'embryon est requise pour réduire le Fe(III) en Fe(II) avant son absorption (Grillet *et al.*, 2013, Roschztardt *et al.*, 2011). Il sera donc intéressant de vérifier si ces mécanismes sont affectés chez les mutants dont les embryons ne sont pas colorés par le Perls/DAB.

Pour les mutants chez lesquels le patron de distribution du fer n'est pas modifié, on pourra suivre la dynamique de mobilisation des stocks de fer au cours de la germination en réalisant des colorations au Perls/DAB à différents stades depuis l'imbibition des graines jusqu'à un stade de plantule âgée d'une dizaine de jours, comme nous l'avons fait dans le cas du mutant *nramp3-2nramp4-2vit1-1*. Afin d'atteindre une échelle tissulaire/cellulaire, on peut envisager de réaliser la coloration au Perls/DAB sur des coupes fines de graines comme décrit par Roschztardt *et al.*, en 2009. Si le patron est conservé à cette échelle, il sera nécessaire d'étudier la localisation du fer à l'échelle subcellulaire. Ceci est possible en employant la microscopie électronique couplée à la fluorescence X (EDX). Cette technique a permis de montrer que le fer est associé aux globoides vacuolaires dans les cellules de l'embryon (Lanquar *et al.*, 2005, Mary *et al.*, en cours de préparation). Il sera important aussi de se poser la question de la spéciation du fer dans les embryons de ces mutants. Cette question peut être abordée par une approche spectroscopique (XAS) ou par une approche biochimique couplant la séparation de biomolécules et l'analyse élémentaire (LC-ICP MS).

4. Faut-il poursuivre le crible ?

Notre stratégie de crible a jusqu'alors sélectionné de nombreux candidats pour n'en confirmer qu'une faible fraction. Après ce travail de thèse, il est important de se poser la question de la poursuite du crible. Presque la moitié des graines M2 obtenues après la mutagenèse EMS du mutant *nramp3nramp4* restent à cribler. Ceci pourrait avoir deux intérêts : d'une part cela pourrait permettre l'identification de nouveaux *loci*, d'autre part cela pourrait permettre d'identifier de nouveaux allèles pour les *loci* déjà identifiés. Les groupes de complémentation allélique n'ont pas été construits et on ne connaît donc pas encore le nombre

de *loci* identifiés par le crible jusqu'à présent. Il est donc difficile de prévoir que la poursuite du crible permettrait d'en découvrir d'autres.

Deux allèles mutants ont été identifiés dans *VIT1*. Le travail réalisé a mis en évidence l'intérêt de ces mutants pour comprendre les relations structure-fonction dans la protéine VIT1. Il est probable que la poursuite du crible permettrait d'identifier de nouveaux allèles mutants de *VIT1* et améliorerait nos connaissances sur VIT1. Si la poursuite du crible a un intérêt indéniable, il paraît plus urgent de valider les mutants déjà obtenus et de les classer par groupes de complémentation.

5. Suppression des autres phénotypes du mutant *nramp3nramp4*

Le crible utilisé au cours de cette thèse est fondé sur la suppression des phénotypes des plantules du double mutant *nramp3nramp4* lors de leur développement sur un milieu pauvre en fer. De nombreux autres phénotypes de ce mutant ont été décrits à différentes étapes de son développement. Le double mutant *nramp3nramp4* est hypersensible au cadmium (Oomen *et al.*, 2009, Molins *et al.*, 2013), sa croissance est ralentie sur milieu carencé en manganèse (Lanquar *et al.*, 2010) et sa résistance à une infection par *Erwinia chrysantemi* est diminuée (Segond *et al.*, 2009). Les mutations *isv* suppriment-elles aussi ces autres phénotypes ? Dans le contexte d'applications en biofortification, il serait préférable d'identifier des acteurs spécifiques de la graine n'ayant pas d'effet pléiotrope aux autres étapes de développement. C'est le cas de *VIT1* dont l'expression est spécifique de la graine en développement. Il a été montré au laboratoire que la mutation *vit1-1* n'affecte pas la tolérance au cadmium (Jérôme Giraudat, données non publiées). Il sera intéressant de tester l'effet des autres mutations supprimeuses identifiées par ce crible sur les multiples phénotypes du mutant *nramp3nramp4*.

6. Conclusion

Cette recherche a pour but d'obtenir de nouvelles connaissances exploitables dans le futur pour la biofortification de graines consommées comme celles de riz, de maïs ou encore de blé. Les premiers mutants caractérisés utilisent toujours la vacuole et ses globuloïdes comme lieu de stockage, n'affectent donc pas son association au phytate. Il est important de poursuivre la caractérisation des autres candidats pour tenter d'identifier les mécanismes qui contrôlent le stockage du fer dans la vacuole sous forme de phytate non-disponible. Cela permettra *in fine* d'orienter le stockage sous formes biodisponibles telles que le fer-ferritine, les complexes fer-nicotianamine ou le fer hémique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Ghany SE, Muller-Moule P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005) Two P-types ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* **17**: 1233-1251
- Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M (2007) The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases **20**: 233-248
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Frimi J, Vert G (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: E450-E458
- Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S (2011) Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory network. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 25-51
- Belouchi A, Cellier M, KwanT, Saini HS, Leroux G, Gros P (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Molecular Biology* **29**: 1181-1196
- Bencze KZ, Kondapalli KC, Cook JD, McMahon S (2006) The structure and function of frataxin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**: 269-291
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Section 19.3 Two Photosystems Generate a Proton Gradient and NADPH in Oxygenic Photosynthesis. In *Biochemistry*. 5th edition. W H Freeman. New York.
- Bienfait HF, Vandenbriel ML (1980) Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta* **631**: 507-510
- Borrill P, Connorton JM, Balk J, Miller AJ, Sanders D, Uauy C (2014) Biofortification of wheat grain with iron and zinc: integrating novel genomic resources and knowledge from model crops. *Frontiers in Plant Science* **5**: 53
- Bouis HE (2003) Micronutrient fortification of plants through plant breeding : can it improve nutrition in man at low cost ? *Proceeding in the Nutrition Society* **62**: 403-411
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoirion S, von Wirén N, Van Wuytswinkel O (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell* **84**: 69-81
- Bruch *et al.*, 2015 Bruch EM, Thomine S, Tabares LC, Un S (2015) Variations in Mn(II) speciation among organisms : what makes *D. radiodurans* different. *Metallomics* **7**: 136-144
- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**: 242-245

Cailliatte R (2008) Caractérisation physiologique et moléculaire de la famille de transporteurs de métaux NRAMP chez *Arabidopsis thaliana*. UMR 5004 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes Supagro/CNRS/INRA/UM2, Montpellier: Supagro. Doctorat, 138

Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, Mari S, Curie C (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**: 217-228

Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, Mari S, Curie C (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *The Plant Cell Online* **22**: 904-917

Cheng L, Wang F, Shou H, Huang F, Zheng L, He F, Li J, Zhao FJ, Ueno D, Ma JF, Wu P (2007) Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiology* **145**: 1647-1657

Chu HH, Chieco J, Punshon T, Lanzirotti A, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2010) Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* YELLOW STRIPE-LIKE1 and YELLOW STRIPE-LIKE3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiology* **154**: 197-210

Clemens S (2014) Zn and Fe biofortification : the right chemical environment for human bioavailability. *Plant Science* **225**: 52-57

Colangelo EP, Guerinot ML (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell* **16**: 3400-3412

Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, Prichard CL, Guerinot ML (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* **133**: 1002-1110

Conte S, Stevenson D, Furner I, Lloyd A (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiology* **151**: 559-573

Conte SS, Chu HH, Chan-Rodriguez D, Punshon T, Vasques KA, Salt DE, Walker EL (2013) *Arabidopsis thaliana* Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Frontiers in Plant Science* **4**: 283

Curie C, Alonso J, Le Jean M, Ecker J, Briat JF (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal* **347**: 749-755

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001) Maize *YELLOW STRIPE1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346-349

Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and YELLOW STRIPE 1-LIKE transporters. *Annals of Botany* **103**: 1-11

- Cvitanich C, Przybylowicz W, Urbanski D, Jurkiewicz A, Mesjasz-Przybylowicz J, Blair M, Astudillo C, Jensen E, Stougaard J (2010) Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in *Phaseolus* seeds. *BMC Plant Biology* **10**: 26
- De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM (2009) Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 4237-4242
- DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis* *Yellow Stripe-Like2* (*YSL2*): a metal regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *The Plant Journal* **39**: 403-414
- Divol F, Couch D, Conéjéro G, Roschztardt, Mari S, Curie C (2013) The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *The Plant Cell* **25**: 1040-1055
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology* **144**: 197-205
- Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wiren N, Soll J, Philipp K (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *The Plant Cell* **19**: 986-1006
- Duy D, Stube R, Wanner G, Philipp K (2011) The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. *Plant Physiology* **155**: 1709-1722
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**: 1349-1349
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5624-5628
- Ehrnstorfer IA, Geertsma ER, Pardon E, Steyaert J, Dutzler R (2014) Crystal structure of the SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for transition-metal ion transport. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 990-996
- Finazzi D, Arosio P (2014) Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Archives of Toxicology* **88**: 1787-1802
- Frey AG, Nandal A, Park JH, Smith PM, Yabe T, Ryu MS, Ghosh MC, Lee J, Rouault TA, Park MH, Philpott CC (2014) Iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metalation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 8031-8036
- Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, Savirón M, Reyt G, Gaymard F, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A, Briat JF (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* **201**: 155-167

García MJ, Romera FJ, Staey MG, Stacey G, Villar E, Alcántara E, Pérez-Vicente R (2013) Shoot to root communication is necessary to control the expression of iron-acquisition genes in Strategy I plants. *Planta* **237**: 65-75

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**: 1425.

Gilloly M, Bothwell TH, Torrance JD, MacPhail AP, Derman DP, Bezwoda WR, Mills W, Charlton RW, Mayet F (1983) The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *British Journal of Nutrition* **49**: 331-342

Gollhofer J, Schläwicke, Jungnick N, Schmidt W, Buckhout TJ (2011) Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 557-564

Gollhofer J, Timofeev R, Lan P, Schmidt W, Buckhout TJ (2014) Vacuolar-Iron-Transporter1-like proteins mediate iron homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **9**: e110468

Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* **17**: 282-286

Green LS, Rogers EE (2004) FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 2523-2531

Grillet L, Ouerdane L, Flis P, Hoang MTT, Isaure MP, Lobinski R, Curie C, Mair S (2013) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **289**: 2515-2525

Guerinot ML, Yi Y (1994) Iron : Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiology* **104**: 815-820

Guerinot ML (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1-2**: 190-198

Haber F, Weiss J (1932) On the catalysis of hyperoxide. *Naturwissenschaften* **20**: 948-950

Hakoyama T, Niimi K, Yamamoto T, Isobe S, Sata S, Nakmura Y, Tabat S, Kumagi H, Umerhara Y, Brossuleit K, Petersen TR, Sandal N, Stougaard J, Udvardi MK, Tmaoki M, Kawaguchi M, Kouchi H, Suganuma N (2012) The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant and Cell Physiology* **53**: 225-236

Halliwell B (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in presence of iron chelates – is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Letters* **92**: 321-326

Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10619-10624

- Johnson AAT, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E, Tester M (2011) Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gen strategies for effective iron- and zinc- biofortification of rice endosperm. PLoS ONE **6**: e24476
- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. Science **314**: 1295-1298
- Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P (2009) The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. Plant Physiology **150**: 257-271
- Lanquar V, Lelievre F, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2004) Regulation and function of AtNRAMP4 metal transporter Protein. Soil science and Plant Nutrition **50**: 1141-1150
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. EMBO Journal **24**: 4040-4051
- Lanquar V, Schnell Ramos M, Lelièvre F, Barbier-Brygoo H, Krieger-Liszkay A, Krämer U, Thomine S (2010) Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. Plant Physiology **152**: 1986-1999
- Laulhere JP, Laboure AM, Briat JF (1990) Photoreduction and incorporation of iron into ferritins. Biochemical Journal **269**: 79-84
- Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss-of-function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. The Plant Journal **44**: 769-782
- Lee S, Jeon US, Lee SJ, Kim YK, Persson DP, Husted S, Schjørring JK, Kakei Y, Masuda H, Nishizama NK, An G (2009) Iron fortification of rice seeds through activation of the *nicotianamine synthase* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 22014-22019
- Lee S, Kim YS, Jean US, Kim YY, Schjørring JK, An G (2012) Activation of rice *nicotianamine synthase 2* (*OsNAS2*) enhances iron availability for biofortification. Molecules and Cells **33**: 269-275
- Li L, Chen OS, Ward DM, Kaplan J (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. Journal of Biological Chemistry **276**: 29515-29519
- Li LY, Cai QY, Yu DS, Guo CH (2011) Overexpression of AtFRO6 in transgenic tobacco enhances ferric chelate reductase activity in leaves and increases tolerance to iron-deficiency chlorosis. Molecular Biology Reports **38**: 3605-3613
- Lin YF, Liang HM, Yang SY, Boch A, Clemens S, Chen CC, Wu JF, Huang JL, Yeh KC (2009) *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. New Phytologist **182**: 392-404

- Ling HQ, Koch G, Baumlein H, Ganai MW (1999) Map-based cloning of *CHLORONERVA*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7098-7103
- Lobréaux S, Briat JF (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *The Biochemical Journal* **274**: 601-606
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **22**: 2219-2236
- Lott JNA, Spitzer E (1980) X-ray analysis studies of elements stored in protein body globoid crystals of *Triticum* grains. *Plant Physiology* **66**: 494-499
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2001) Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 392-397
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2001) Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 828-834
- Lung'aho MG, Mwaniki AM, Szalma SJ, Hart JJ, Rutzke MA, Kochian LV, Glahn RP, Hoekenga OA (2011) Genetic and physiological analysis of iron biofortification in maize kernels. *PLOS ONE* **6**: e20429
- Marentes E, Grusak MA (1998) Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Seed Science Research* **8**: 575-582
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic press, Boston
- Masuda H, Usuda K, Kobayashi T, Ishimaru Y, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene *HsNAS1* increases iron and zinc concentrations in rice grains. *Rice* **2**: 155-166
- Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa NK (2012) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Scientific Reports* **2**: 543
- Masuda H, Kobayashi T, Ishimaru Y, Takahashi M, Aung MS, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2013) Iron-biofortification in rice by the introduction of three barley genes participated in mugineic acid biosynthesis with soybean ferritin gene. *Frontiers in Plant Science*
- McNellis TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Miséra S, Deng XW (1994) Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *The Plant Cell* **6**: 487-500
- Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K (2007) Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Archives of Histology and Cytology* **70**: 1-19

Mendoza-Cózatl DG, Xie Q, Akmakjian GZ, Jobe TO, Patel A, Stacey MG, Song L, Demoin DW, Jurisson SS, Stacey G, Shroeder JI (2014) OPT3 is a component of the iron signaling network between leaves and roots and misregulation of OPT3 leads to an over-accumulation of cadmium in seeds. *Molecular Plant* **7**: 1455-1469

Molins H, Michelet L, Lanquar V, Agorio A, Giraudat J, Roach T, Krieger-Liszkay A, Thomine S (2013) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplast as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **36**: 804-817

Momono K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori, Shoji K, Nitta A, Nishimura M (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *The Plant Journal* **59**: 437-447 *et al.*, 2009

Morrissey J, Guerinot ML (2009) Iron uptake and transport in plants : The Good, the Bad, and the Ionome. *Chemical Reviews* **109**: 4553-4567

Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li LT, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML (2009) The FERROPORTIN metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 3326-3338

Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**: 1178-1190

Nevo Y, Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 609-620

Nielsen AVF, Tetens I, Meyer AS (2013) Potential of phytase-mediated iron release from cereal-based foods: a quantitative view. *Nutrients* **5**: 3074-3098

Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 5446-5454

Obulareddy, N., Panchal, S. et Melotto, M. (2013) Guard cell purification and RNA isolation suitable for high throughput transcriptional analysis of cell-type responses to biotic stresses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 844-849

Oomen RJ, Wu J, Lelièvre F, Blanchet S, Richaud P, Barbier-Brygoo H, Aarts MG, Thomine S (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **181**: 637-650

Otegui MS, Capp R, Staehelin LA (2002) Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell* **14**: 1311-1327

Palmgren MG (2001) Plant plasma membrane H⁺ ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 817-845

Phillips GN (1997) Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology* **7**: 821-827

Porra, Thompson & Kriedemann, 1989 Porra R, Thompson W, Kriedemann P(1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents : verification of the concentration of chlorophyll II standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384-394

Raboy V (2009) Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science* **177**: 281-296

Ranganathan R, Lewis JH, MacKinnon R (1996) Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**: 131-139

Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**: 400-412

Ravet K, Touraine B, Kim SA, Cellier F, Thomine S, Guerinot ML, Briat JF, Gaymard F (2009) Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular trafficking during fruit development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **2**: 1095-1106

Rellán-Álvarez R, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2008) Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-off light mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**: 1553-1562

Rellán-Álvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodríguez-Castríllon JA, García-Alonso JJ, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2010) Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology* **51**: 91-102

Robinson NJ, Procter CM, Connelly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697

Rodríguez-Celma J, Lin WD, Fu GM, Abadía J, López-Millán AF, Schmidt W (2013) Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **162**: 1473-1485

Rogers EE, Guerinot ML (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 1787-1799

Roschzttardtz H, Conejero G, Curi C, Mari S (2009) Identification of endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiology* **151**: 1329-1338

Roschzttardtz H, Séguéla-Arnaud M, Briat J-F, Vert G, Curie C (2011) The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* **23**: 2725-2737

- Roschztardt H, Conéjéro G, Dival F, Alcon C, Verdeil JL, Curie C, Mari S (2013) New insights into Fe localization in plant tissues. *Frontiers in Plant Science* **4**: 350
- Santi S, Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* **183**: 1072-1084
- Schaaf G, Schikora A, Haberle J, Vert G, Ludewig U, Briat JF, Curie C, vonWirén N (2005) A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **46**: 762-774
- Schmid NB, Giehl RFH, Döll S, Mock HP, Strehmel N, Scheel D, Kong X, Hider RC, von Wirén N (2014) Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase1-dependant coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **164**: 160-172
- Schmidt H, Günther C, Weber M, Spörlein C, Loscher S, Böttcher C, Schobert R, Clemens S (2014) Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *PLOS ONE* **9**: e102444
- Schmidt W, Buckhout TJ (2011) A hitchhiker's guide to the *Arabidopsis* ferrome. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 462-470
- Schnell Ramos M, Khodja H, Mary V, Thomine S (2013) Using μ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Frontiers in Plant Science* **4**: 168
- Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, Abadía J, Bauer P (2012) Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 2380-2400
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, Rigault M, Patrit O, Thomine S, Expert D (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal* **58**: 195-207
- Shimoni-Shoor E, Hassidim M, Yuval-Naeh N, Keren N (2010) Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant, Cell and Environment* **33**: 1029-1038
- Shingles R, North M, McCarty RE (2002) Ferrous iron transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiology* **128**: 1022-1030
- Sivitz AB, Hermand V, Curie C, Vert G (2012) *Arabidopsis* bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLOS ONE* **7**: e44843
- Stacey MG, Koh S, Becker J, Stacey G (2002) AtOPT3, a member of the oligopeptide transporter family, is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 2799-2811

- Stacey MG, Osawa H, Patel A, Gassmann W, Stacey G (2006) Expression analyses of *Arabidopsis* oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta* **223**: 291-305
- Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology* **146**: 589-601
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell* **15**: 1263-1280
- Takahashi M, Nozoye T, Kitajima N, Fukuda N, Hokura A, Terada Y, Nakai I, Ishimaru Y, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK (2009) In vivo analysis of metal distribution and expression of metal transporters in rice seed during germination process by microarray and X-ray fluorescence imaging of Fe, Zn, Mn and Cu. *Plant Soil* **325**: 39-51
- Theil EC (1987) FERRITIN - Structure, gene-regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 289-315
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4991-4996
- Thomine S, Lelièvre F, Debardieux E, Schroeder J, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* **34**: 685-695
- Varotto C, Maiwald D, Pesaresi P, Jahns P, Salamini F, Leister D (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **31**: 589-599
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Walker EL, Waters BM (2011) The role of transition metal homeostasis in plant seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 318-324
- Waters BM, Chu HH, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in *Arabidopsis* *YELLOW STRIPE-LIKE1* and *YELLOW STRIPE-LIKE3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiology* **141**: 1446-1458
- Waters BM, Grusak MA (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. *New Phytologist* **177**: 389-405

Welch RM, Graham RD (2004) Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* **55**: 353-364

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLOS ONE* **2**: e718

Yi Y, Guerinot ML (1996) Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *The Plant Journal* **10**: 835-844

Yoshida K, Negishi T (2013) The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry* **94**: 60-67

Yuan YX, Wu HL, Wang N, Li J, Zhao WN, Du J, Wang DW, Ling HQ (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Research* **18**: 385-397

Zhai Z, Gayomba SR, Jung HI, Vimalakumari NK, Piñeros M, Craft E, Rutzke MA, Danku J, Lahner B, Punshon T, Guerinot ML, Salt DE, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2014) OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**: 2249-2264

Zhang Y, Xy YH, Yi HY, Gong JM (2012) Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *The Plant Journal* **72**: 400-410

ANNEXES

ANNEXE 1

Liste de 32 candidats confirmés en crible secondaire
(selon leur phénotype sur milieu – Fe + 50 μ M ferrozine)

1-1.2	14-6.1
1-11	14-6.2
3-4 (<i>isv1</i>)	14-14.2
4-6	14-14.4
5-17 (<i>isv4</i>)	14-15.3
6-8 (<i>isv2</i>)	14-17.1
6-14.1 (<i>isv3</i>)	14-17.2
8-14	14-18
10-7	14-19.1
11-3	15-5.1
11-7	15-7
12-13.2	15-8
12-17	15-9
13-8.1	15-12
13-12.6	15-13.1
14-2.3	15-13.2

ANNEXE 2

Liste des candidats confirmés dont on dispose de F1

Hétérozygotie des plantes F1 testées

1-1.2, 1-11, 5-17, 6-14.1, 10-7, 14-2.3, 14-14.2, 14-15.3, 14-17.2, 14-19.1, 15-9

Génotypage des plantes F1 à faire

13-8.1, 14-6.1, 14-6.2, 14-17.1, 15-8, 15-13.2

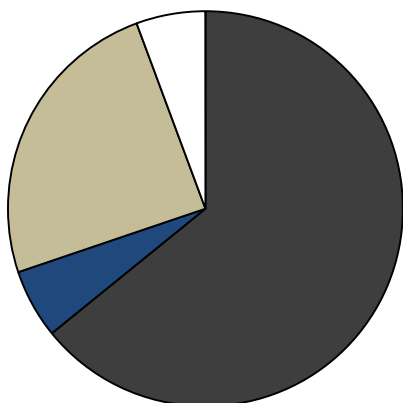
Homozygotie mutantes des plantes F1 testées

3-4, 6-8, 8-14, 11-3, 12-13.2, 13-12.6, 14-14.4, 15-5.1, 15-12

ANNEXE 3

Classification au Perls/DAB des candidats (testés, confirmés et disponibles en F2 homozygotes *nramp3nramp4*)

Candidats testés au Perls/DAB : 50



34 candidats au patron similaire à Col0

1-1.2	7-14.1	14-2.3
1-11	8-11	14-6.1
3-15	8-14	14-14.2
4-5	10-7	14-14.4
4-6	11-3	14-15.3
4-13	11-7	14-17.1
5-17	11-19.2	14-18
5-18	11-24	15-7
5-19	12-17	15-9
6-14.2	13-8.1	15-13.1
7-4	13-12.2	
7-5	13-12.4	

13 candidats chez lesquels aucune coloration n'apparaît dans l'embryon

7-10	13-8.2
10-19	14-17.2
11-19.1	14-19.1
12-13.1	15-5.1
12-13.2	15-12
13-2.1	15-13.2
13-2.2	

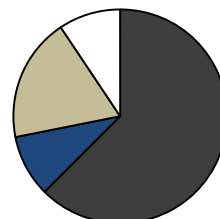
3 candidats au patron similaire à *vit1-1*

3-4	6-8	6-14.1
-----	-----	--------

3 candidats à tester

13-12.6	14-6.2	15-8
---------	--------	------

Candidats testés et confirmés : 29



20 candidats au patron similaire à Col0

1-1.2	14-2.3
1-11	14-6.1
4-6	14-14.2
5-17	14-14.4
8-14	14-15.3
10-7	14-17.1
11-3	14-18
11-7	15-7
12-17	15-9
13-8.1	15-13.1

6 candidats chez lesquels aucune coloration n'apparaît dans l'embryon

12-13.2	15-5.1
14-17.2	15-12
14-19.1	15-13.2

3 candidats au patron similaire à *vit1-1*

3-4	6-8	6-14.1
-----	-----	--------

3 candidats à tester

13-12.6	14-6.2	15-8
---------	--------	------

Candidats testés, confirmés et aux F2 disponibles/génotypés : 11



6 candidats au patron similaire à Col0

8-14	14-2.3
11-3	14-14.4
13-8.1	14-17.1

3 candidats chez lesquels aucune coloration n'apparaît dans l'embryon

12-13.2	15-5.1	15-12
---------	--------	-------

2 candidats au patron similaire à *vit1-1*

3-4	6-8
-----	-----

3 candidats à tester

13-12.6	14-6.2	15-8
---------	--------	------

ANNEXE 4

Article

“Using μ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds”

Article publié en 2013 intégrant la revue « Frontiers in Plant Science » sous le thème de recherche « Cellular Iron homeostasis and Metabolism in Plant »



Using μ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds

Magali Schnell Ramos^{1,2*}, Hicham Khodja³, Viviane Mary¹ and Sébastien Thomine¹

¹ Institut des Sciences du Végétal, UPR2355, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France

² Chimica Agraria, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy

³ Laboratoire d'Etude des Eléments légers, SIS2M, UMR 3299, CEA-CNRS, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Edited by:

Jean-François Briat, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Stéphane Mari, Institut National pour la Recherche Agronomique, France

Marie-Pierre Isaure, Université de Pau et des Pays de l'Adour and CNRS, France

*Correspondence:

Magali Schnell Ramos, Chimica Agraria, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Via delle Scienze 208, 33100 Udine, Italy
e-mail: magali.schnell@uniud.it

Seeds are a crucial stage in plant life. They contain the nutrients necessary to initiate the development of a new organism. Seeds also represent an important source of nutrient for human beings. Iron (Fe) and zinc (Zn) deficiencies affect over a billion people worldwide. It is therefore important to understand how these essential metals are stored in seeds. In this work, Particle-Induced X-ray Emission with the use of a focused ion beam (μ PIXE) has been used to map and quantify essential metals in *Arabidopsis* seeds. In agreement with Synchrotron radiation X-ray fluorescence (SXRF) imaging and Perls/DAB staining, μ PIXE maps confirmed the specific pattern of Fe and Mn localization in the endodermal and subepidermal cell layers in dry seeds, respectively. Moreover, μ PIXE allows absolute quantification revealing that the Fe concentration in the endodermal cell layer reaches $\sim 800 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. Nevertheless, this cell layer accounts only for about half of Fe stores in dry seeds. Comparison between *Arabidopsis* wild type (WT) and mutant seeds impaired in Fe vacuolar storage (*vit1-1*) or release (*nramp3nramp4*) confirmed the strongly altered Fe localization pattern in *vit1-1*, whereas no alteration could be detected in *nramp3nramp4* dry seeds. Imaging of imbibed seeds indicates a dynamic localization of metals as Fe and Zn concentrations increase in the subepidermal cell layer of cotyledons after imbibition. The complementarities between μ PIXE and other approaches as well as the importance of being able to quantify the patterns for the interpretation of mutant phenotypes are discussed.

Keywords: iron, seed, *Arabidopsis*, μ PIXE, elemental mapping, quantitative

INTRODUCTION

Thanks to their redox properties or Lewis acid strength under physiological conditions, iron (Fe), manganese (Mn), copper (Cu), or zinc (Zn) act as major cofactors in many enzymes such as proteases or antioxidant enzymes as well as in electron transfer chains of mitochondrial respiration or chloroplast photosynthesis (Marschner, 2012). While micronutrients are essential at adequate concentrations, excess leads to toxicity. Moreover, certain trace metals such as cadmium (Cd) or mercury (Hg) have no known function as nutrients and are potentially toxic at low concentrations (Clemens, 2006; Clemens et al., 2013). Therefore, mechanisms for tight regulation of metal homeostasis are vital (Kraemer and Clemens, 2006; Marschner, 2012).

Seeds are a crucial stage in the life of a plant. They contain the macro- and micronutrients necessary to initiate the development of a new organism. More specifically, essential micronutrients need to be safely stored and readily remobilized during early germination. Seeds also represent an important source of nutrient for human beings. Fe and Zn deficiencies affect over a billion people worldwide (Murgia et al., 2012). Consequently, studies on seed transition metal content are necessary. Despite its relatively high abundance, Fe availability remains limited for living organisms. In seeds, Fe is stored either as highly bio-available phytoferritins localized in plastids, or as poorly bio-available

Fe-phytate salts, localized in vacuolar inclusions called globoids (Harrison and Arosio, 1996; Briat and Lobreaux, 1997; Otegui et al., 2002; Lanquar et al., 2005). The balance between those two forms is different according to plant species and is greatly modified during germination. Besides, in seeds, phytate salts are also the main storage form of potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca), and Zn (Mikus et al., 1992).

In *Arabidopsis*, VIT1, a vacuolar Fe transporter required for Fe storage in the vacuole during seed formation, was identified by Kim et al. (2006). Synchrotron radiation X-ray fluorescence (SXRF) tomographic imaging demonstrated that loss of VIT1 function disrupts the cell specific localization of Fe in dry seeds. Whereas Fe is stored in endodermal cells surrounding the provascular tissues in wild type (WT), it co-localizes with Mn in the subepidermal cell layer of *vit1-1* knockout mutant embryos (Kim et al., 2006; Roschztardtz et al., 2009). Fe mislocalization results in drastically decreased viability of *vit1-1* seedlings under Fe deficiency. While VIT1 mediates Fe influx into the vacuole, NRAMP3 and NRAMP4 metal transporters have been shown to act redundantly to export Fe out of the vacuole (Lanquar et al., 2005). Energy-Dispersive X-ray (EDX) technique indicated that the *nramp3nramp4* double knockout mutant is defective in Fe retrieval from seed vacuolar globoids during germination. As a consequence, *nramp3nramp4* mutant seedlings display an early

developmental arrest when germinated on low Fe. Furthermore, the drastic morphological and biological changes that occur during germination must be accompanied by a relocation of nutrients to the sites where they are required for metabolism. Although several reports have addressed metal patterning in dry seed, the changes in metal localization and their kinetics upon seed germination have not been addressed at the tissue level. Three imaging techniques have been used to investigate Fe distribution in Arabidopsis WT and mutant seeds EDX (Lanquar et al., 2005), SXRF (Kim et al., 2006), and Perls/DAB staining (Roschztardt et al., 2009). However, those techniques provided either non-quantitative data (EDX, Perls/DAB) or approximate quantification (SXRF) of metal concentrations in the different seed tissues.

Particle-Induced X-ray Emission induced by a focused ion beam (μPIXE) allows multi-elemental mapping in biological samples with high spatial resolution (1 μm range) and high sensitivity (down to μg·g⁻¹ range). Importantly, μPIXE technique presents the unique advantage of providing quantitative results when used simultaneously with Rutherford Backscattering (RBS) and Scanning Transmission Ion Microscopy (STIM) analyses (Deves et al., 2005). The combined measurements of trace element amount by PIXE, charge monitoring and organic element determination by RBS and sample local mass determination by STIM are often referred as “fully” quantitative results in the literature in opposition to “semi”-quantitative results obtained by other imaging techniques.

In plants, μPIXE has been used for the localization and quantification of essential macro- and micronutrients in specific tissues and organs such as elemental mapping of buckwheat seeds (Vogel-Mikus et al., 2009), Fe in barley roots (Schneider et al., 2002), Fe and Zn in Phaseolus seeds (Cvitanich et al., 2010, 2011), Cu in *Brassica carinata* leaf and root (Cestone et al., 2012). μPIXE was also used to image and quantify non-essential elements. In the context of environmental contamination, μPIXE was used to study cesium (Cs) in Arabidopsis leaf, stem, and trichome (Isaure et al., 2006), Cd and Ni in soybean seed (Malan et al., 2012), and uranium (U) in leaf and root of oilseed rape, sunflower, and wheat (Laurette et al., 2012). In the context of metal hyperaccumulation, it was used to analyze Cd in leaf and seed of *Thlaspi praecox* (Vogel-Mikus et al., 2007, 2008) or nickel (Ni) in *Berkheya coddii* leaves (Budka et al., 2005).

Here, the μPIXE approach was used to quantitatively analyze metal distribution in Arabidopsis seeds. A sample preparation protocol suitable for μPIXE analysis of *Arabidopsis thaliana* dry but also imbibed seeds was established. Analysis of some nutritionally important elements by μPIXE mapping confirmed the previously established pattern in WT dry seed metal distribution, exhibiting Mn accumulation at the abaxial side of cotyledons as well as Fe localization around the provascular tissues. Local Fe, Mn, and Zn concentrations were determined in these tissues in WT and both *nramp3nramp4* and *vit1-1* mutant seeds. Moreover, a comparison between elemental maps obtained with dry or imbibed seeds revealed early changes in metal localization. The μPIXE results are put in perspective with other elemental analysis techniques raising questions regarding the input of element quantification in the interpretation of mutant phenotypes.

Finally, μPIXE results obtained for WT dry and imbibed seeds are discussed with respect to the possible use of this technique to study dynamic element redistribution.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Mature (dry) and imbibed seeds of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* accession Columbia-0) WT, *nramp3nramp4* (*nr3nr4*) and *vit1-1* mutants were used. Generation of both mutants has been described previously in Ravet et al. (2009b) and Kim et al. (2006), respectively. Dry seeds of all genotypes were harvested from plants grown on potting soil (Tonerde PAM argile, Brill France) in a greenhouse under a 16 h photoperiod with regular watering (2–3 times per week). Seeds were imbibed in deionized water on an orbital shaker (40 rotations·min⁻¹), under continuous light (60 μmol photon·m⁻²·s⁻¹) at 21°C for 48 h.

AAS ANALYSES OF DRY SEEDS

Three to four replicates of circa 20 mg of dry seeds were digested in 2 ml of 70% nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 80°C for 1 h, 100°C for 1 h, and 120°C for 2 h. After dilution to 12 ml with ultrapure water, K, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn contents of the samples were determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

SAMPLE PREPARATION FOR μPIXE ANALYSIS

In order to avoid losses of elements and their redistribution in the analysed samples, cryotechniques were used. The seeds were fixed by high pressure cryofixation (Leica EM PACT2, Leica Microsystems, Germany) and stored in liquid nitrogen. Subsequent steps were performed in a cryostat (CM3050-S, Leica Microsystems, Germany) at -30°C: seeds were recovered from their cryofixation container in cold isopentane, embedded in an inert matrix (Tissue-Tek® OCT compound, Sakura Finetek, USA) and cut with a tungsten blade in sections of approximately 30 μm. Sections were individually mounted on a cold aluminium sample holder covered with a pioloform film (1 g pioloform, 75 ml chloroform). Samples were carefully transferred to a freeze-dryer (Alpha 1-4, Christ Martin, Germany), freeze-dried at -10°C, under a vacuum of 0.37 mbar for 48 h and brought back to room temperature (RT) by steps of 5°C per hour. Finally, samples were covered by a second pioloform film and stored in an anhydrous environment at RT until μPIXE analyses. Section integrity of seed sample was verified by putting a few freshly cut sections directly on a microscope slide (Menzel-Gläser SUPERFROST®, Thermo Fisher Scientific, USA) stored in the cryostat. After sectioning, the microscope slides mounted with seed sections were quickly brought to RT in a vacuum desiccator and checked under a light microscope.

MULTI-ELEMENTAL LOCALIZATION BY μPIXE

Microanalyses of Arabidopsis sections were performed at the Saclay nuclear microprobe, France (Khodja et al., 2001). The sample holder with seed sections and reference samples were attached to a motorized vacuum goniometer in the analyzing chamber. After closing the chamber and establishing a vacuum (typically 10⁻⁶ mbar), rough positioning of the samples was

achieved using an optical camera. The proton beam of 3.0 MeV and 200 pA current was focused down to a $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ spot, used to rapidly scan large areas of the sample and finally adjusted to scan the seed section areas (usually $500 \times 500 \mu\text{m}^2$) during circa 4 h. Simultaneous PIXE, RBS, and STIM analyses were performed. A 40 mm^2 -Bruker XFlash SDD detector placed at 75° relative to the beam path and at 21 mm working distance of the scanned sample was used to collect X-rays emitted by non-organic elements. A $50 \mu\text{m}$ Mylar foil was placed in front of the detector to stop backscattered protons and attenuate X-ray signals from major elements. Backscattered particles were collected by a 180 mm^2 -surface barrier detector positioned at 170° and 35 mm from incident beam. Energy-loss maps based on STIM were obtained by collecting scattered particles at 30° using a surface barrier detector located behind the sample. In total, 11 seed sections were analyzed: 5 from WT, 5 from *nramp3nramp4* mutant and 1 from *vit1-1* mutant.

MULTI-ELEMENTAL QUANTIFICATION BY μPIXE

In order to generate μPIXE qualitative elemental images, PIXE spectra of the scanned Arabidopsis sections were processed using RISMIN software (Daudin et al., 2003). Distinct regions of particular interest (ROIs) such as seed morphological structures or areas enriched for one particular element were selected as ROIs on the elemental images and the corresponding X-ray spectra were extracted. Associated RBS and STIM spectra and images were used to assess thickness and matrix composition of the different ROIs using SIMNRA (Mayer, 1999) and a modified version of RISMIN software. Finally, all elemental quantifications were obtained by processing the extracted data using SIMNRA and GUPIX (Campbell et al., 2000) softwares. Concentrations of the elements present in the selected ROIs (whole seed section, Fe- and Mn-enriched areas) are presented, either as elemental concentrations of one representative sample (Table 2), or as average elemental concentrations of three to four representative samples (Figures 5A,B).

DATA ANALYSES

Average elemental concentrations presented in (Figures 5A,B) as well as elemental fractions presented in Table 3, were analysed by a Kruskal–Wallis test followed by a Tukey *post-hoc* test for multiple comparisons ($p < 0.05$). For both dry and imbibed seeds, fractions of Fe and Mn that accumulate in their respective enriched areas compared to the whole seed section element content were calculated as followed: [element concentration in enriched area-area of enriched area]/[element concentration in whole seed section-area of whole seed section].

RESULTS

SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSES

Seed samples were prepared as recommended in Mesjasz-Przybyłowicz and Przybyłowicz (2002) and described in Materials and Methods. The chosen section thickness was $30 \mu\text{m}$ to obtain the best compromise between 3 requirements: (1) analysing a sufficient amount of matter by μPIXE to obtain accurate quantification, (2) the ability to record RBS and STIM complementary signals, and (3) to resolve Arabidopsis seed morphology ($30 \mu\text{m}$

corresponds to circa 2 cell layers). A cryogenic approach was used to prevent element leakage or redistribution within the sample sections (Mesjasz-Przybyłowicz and Przybyłowicz, 2002). Due to Arabidopsis seed small size, high-pressure freezing was used. In order to confirm that cryosectioning did not alter seed structure, some sections were put aside and directly observed under light microscopy after being rapidly brought back to RT. In agreement with previous reports, Arabidopsis dry seed morphological structure could be clearly defined for $30 \mu\text{m}$ thick longitudinal and transversal sections (Figure 1) (e.g., Vaughan and Whitehouse, 1971). After high-pressure freezing, samples could be either freeze-dried or freeze-substituted as no module for frozen-hydrated state specimen analysis was available (Tylko et al., 2007). Freeze-drying technique has been demonstrated to be neither suitable for observations at the cellular level since it may alter the morphology of the samples, nor for metal speciation since water extraction induces metal speciation artifacts (Sarret et al., 2009). However, freeze-drying is appropriate for elemental mapping, in particular for Fe, at the tissue level and thus, was used in this research (Schneider et al., 2002; Sarret et al., 2013). Furthermore, preliminary tests showed that the substitution of vitrified water by EPOXY resin lead to partial to complete leakage of some elements (data not shown).

ARABIDOPSIS SEED ELEMENTAL DISTRIBUTION USING μPIXE TECHNIQUE

Freeze-dried $30 \mu\text{m}$ thick sections of *Arabidopsis thaliana* dry and imbibed seeds were analysed by Particle-Induced X-ray Emission induced by a focused ion beam (μPIXE) and elemental images were generated (Figure 2). Some macroelements, such as K, and microelements such as Zn are apparently evenly distributed over the dry seed section (Figure A1). Mapping of Ca, which is evenly distributed in the embryo and accumulates to a higher level in

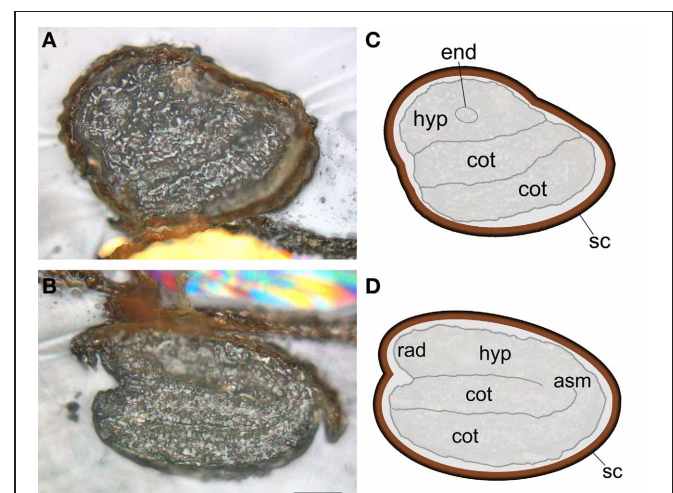


FIGURE 1 | *Arabidopsis thaliana* dry seed structure. Light microscopy images of transversal (A) and longitudinal (B) sections with respective schematic representations (C,D). Thirty micrometer sections were obtained at -30°C using a cryomicrotome. Scale bar: $100 \mu\text{m}$; asm, apical shoot meristem; cot, cotyledon; end, endodermis; hyp, hypocotyl; rad, radicle; sc, seed coat.

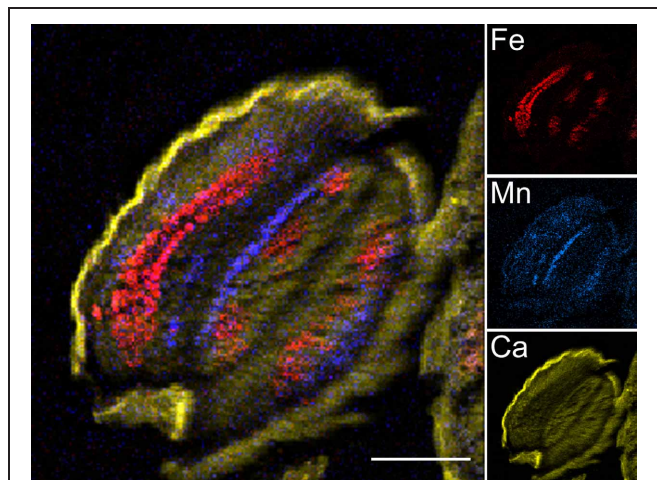


FIGURE 2 | μ PIXE elemental reconstituted image of *Arabidopsis thaliana* dry seed section. Total X-ray spectra of areas scanned with 3 MeV proton beam were collected. Specific distributions of Fe, Mn, and Ca in a 30 μ m thick longitudinal section of *Arabidopsis* dry seed are shown overlaid (large image) and separately (small images). False color images and reconstitution were obtained using ImageJ free software. Scale bar: 100 μ m; red, Fe; blue, Mn; yellow, Ca.

the seed coat, allows the visualization of general seed morphology, recalling the light microscopy image (compare **Figures 1B, 2**, Ca inset). Other elements, such as Fe and Mn, exhibited more specific localization in particular structures, organs or tissues. The elemental map of Fe highlighted the provascular tissue in the cotyledons, hypocotyl and radicle while the Mn elemental map showed concentration on the abaxial (lower) side of the cotyledons (**Figure 2**, Fe and Mn insets). Subsequently, elemental images were used to select regions specifically enriched in Fe or Mn within sections (regions of interest, ROIs; **Figure 3**) to determine the element concentrations within ROIs.

SEED ELEMENTAL CONTENT ANALYSES

Dry seed bulk sample analyses of *Arabidopsis* WT, *nramp3nramp4* and *vit1-1* were performed by atomic absorption spectroscopy (AAS) to determine seed concentrations of various macro- and microelements (**Table 1**). As previously reported, for all quantified elements, no notable differences were observed between seeds of the different genotypes (Lanquar et al., 2005; Kim et al., 2006; Young et al., 2006). Some seeds of the analysed batches were set aside and analysed by μ PIXE to determine elemental concentration in the ROI corresponding to the whole seed section (**Table 1**). In general, seed element average concentrations obtained by μ PIXE for each genotype were in the same range of concentrations but usually higher when compared to AAS analyses (**Table 1**). This difference can be partly explained by the huge difference in the sample sizes used for each technique. AAS elemental content analyses of circa 1800 *Arabidopsis* dry seeds (20 mg aliquots) are compared with μ PIXE analyses of few 30 μ m-thick seed sections (approximately 2 cell layers). Single seed elemental variability, seed cell heterogeneity as well as low replicate number inherent to the technique have a larger impact on the seed elemental content measured by μ PIXE.

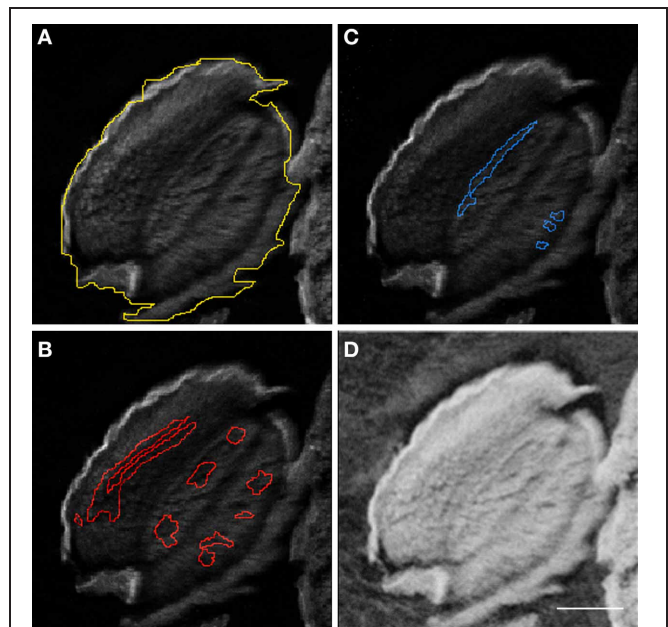


FIGURE 3 | Regions of interest for μ PIXE elemental quantification. Element distribution maps allowed selection of regions of interest (ROI). *Arabidopsis thaliana* whole seed (**A**), Fe- (**B**), and Mn- (**C**) ROIs are shown using the Ca distribution map as background. The associated STIM image (**D**) shows the local mass of the sample which is necessary for quantification. Scale bar: 100 μ m.

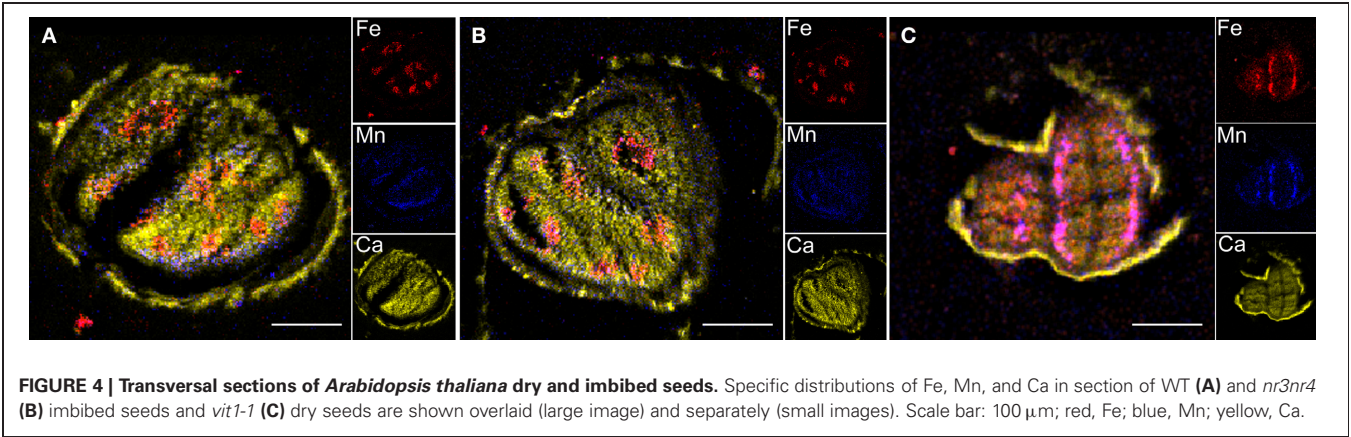
Elemental images obtained for the three genotypes showed that Fe distribution is strongly perturbed in *vit1-1* mutant whereas it is not affected in *nramp3nramp4* dry seed at the same stage (**Figure 4**). Similar elemental distribution patterns were obtained using SXRF microtomography (Kim et al., 2006; Donner et al., 2012). ROIs corresponding to whole seed section, Fe- or Mn-enriched areas were selected on the images of each genotype and the corresponding PIXE, RBS, and STIM extracted spectra were analysed (**Table 2**). In WT and *nramp3nramp4* dry seed sections, element quantification within the ROIs confirmed the accumulation of Fe around the provascular tissues of the radicle and cotyledons (from 159 μ g.g⁻¹ DW in the whole section, up to 751 μ g.g⁻¹ DW in Fe-enriched area) and of Mn at the abaxial side of cotyledons (from 44 μ g.g⁻¹ DW up to 386 μ g.g⁻¹ DW). Surprisingly, slight accumulation of Zn also occurred in the Fe-enriched area (from 141 μ g.g⁻¹ DW up to 311 μ g.g⁻¹ DW). In *vit1-1* dry seed, Fe (up to 360 μ g.g⁻¹ DW) and Mn (up to 172 μ g.g⁻¹ DW) concentrated in a single Fe- and Mn-enriched area at the abaxial side of the cotyledons, while no Fe accumulation around provascular tissues was observed. Here also, Zn (up to 224 μ g.g⁻¹ DW) exhibited a slight accumulation within the combined enriched area.

The concentrations of Fe, Mn, and Zn in whole longitudinal and transversal seed sections as well as Fe- and Mn-enriched areas from dry and imbibed samples of WT and *nramp3nramp4* were measured. Statistical analyses of the results did not reveal any significant difference between WT and *nramp3nramp4* in any of the ROIs analysed. **Figure 5** shows the average concentrations

Table 1 | AAS analysis and μPIXE quantification of various elements in three different *Arabidopsis thaliana* seed genotypes.

El.	AAS—dry seed				μPIXE—seed section					
	WT	<i>nr3nr4</i>	<i>vit1-1</i>	LOD	WT	LOD	<i>nr3nr4</i>	LOD	<i>vit1-1</i>	LOD
	μg · g ⁻¹ DW	μg · g ⁻¹ DW	μg · g ⁻¹ DW		μg · g ⁻¹ DW		μg · g ⁻¹ DW		μg · g ⁻¹ DW	
K	11881 ± 188	11272 ± 463	11909 ± 663	0.008	17648	36	19989	30	27274	52
Ca	4200 ± 208	4590 ± 288	4445 ± 329	0.001	9165	85	11223	82	9757	77
Mn	32 ± 4	34 ± 3	33 ± 3	0.001	44	4	58	4	65	8
Fe	78 ± 5	73 ± 1	80 ± 13	0.006	159	3	189	3	157	8
Cu	10 ± 1	12 ± 1	11 ± 0	0.001	10	2	20	2	68	3
Zn	58 ± 5	59 ± 7	62 ± 5	0.001	141	2	197	2	169	6

AAS of bulk samples. Values are means ± SE (n = 3–4 dry seed batches for each genotypes). X-ray and RBS spectra of the whole seed section were selected using RISMN software and analysed using SIMNRA and GUPIX softwares. Concentrations of one representative measured sample are presented; LOD, limit of detection of the measurements (μg·g⁻¹ DW).



of Fe, Mn, and Zn in the whole seed section, Fe- and Mn-enriched areas from dry and imbibed samples. In both sample types, Fe ($751 \pm 134 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$ and $910 \pm 74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) significantly accumulated in Fe-enriched provascular area as expected (Figures 5A,B). As already indicated in Table 2, Zn average concentrations were also significantly higher in Fe-enriched areas of both dry and imbibed seeds ($298 \pm 9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$ and $284 \pm 18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$). Mn accumulated at significantly higher concentration in the Mn-enriched area at the abaxial side of the cotyledons of both dry and imbibed seeds (Figures 2, 4, 5 and Table 2). Interestingly, after 48 h of imbibition, Fe ($577 \pm 61 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) and Zn ($268 \pm 14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) were also significantly more concentrated within Mn-enriched area at the abaxial side of the cotyledons. These changes were not detectable visually on the elemental maps.

Finally, combining the relative areas of Fe- and Mn-enriched areas and the metal concentration within these areas, we calculated the fractions of Fe and Mn accumulated in their corresponding enriched areas, namely the provascular tissue region for Fe and the abaxial side of the cotyledons for Mn (Table 3). These calculations revealed that at most 69 and 54% of Fe and Mn, respectively, were localized within these areas. A significant fraction of seed Fe and Mn stores is thus localized outside the areas where these metals are the most concentrated.

DISCUSSION

Images of Arabidopsis dry seed sections obtained by μPIXE confirmed Fe, Mn, and Zn distribution patterns observed previously in WT, *nramp3nramp4* and *vit1-1* mutant dry seeds. In addition, valuable information about local metal concentrations could be obtained from the analyses of the different types of spectra collected at the microprobe installation.

μPIXE COMPLEMENTS OTHER TECHNIQUES FOR ELEMENTAL IMAGING OF SEEDS

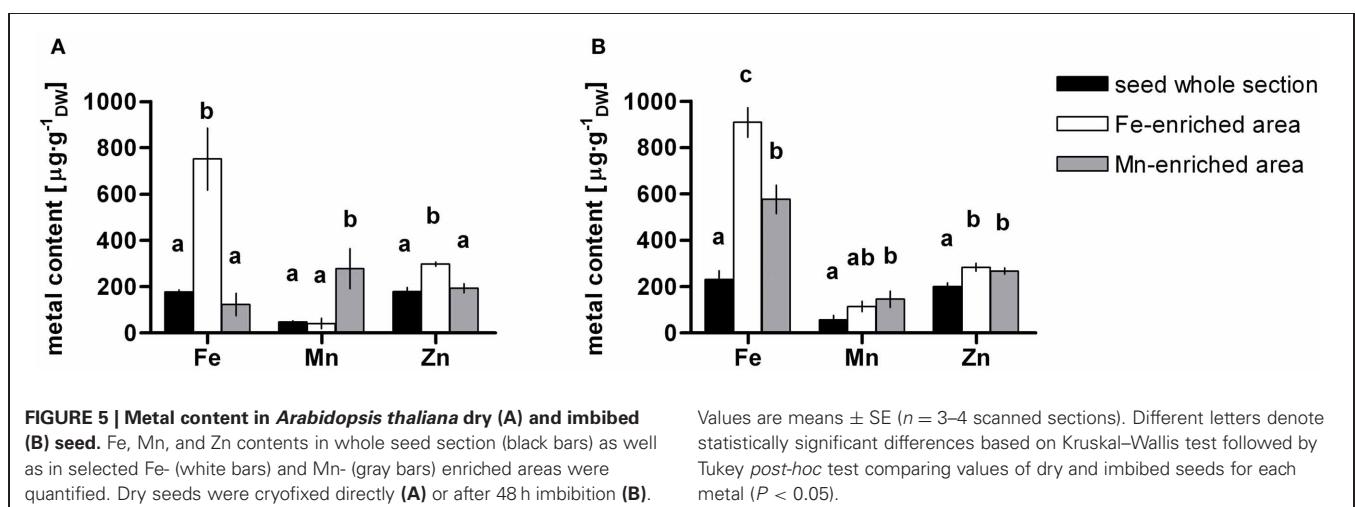
Fe distribution in Arabidopsis seeds has been already reported using different imaging techniques: EDX microanalysis on a transmission electron microscope (Lanquar et al., 2005), Fe histochemical localization using Perls staining with DAB enhancing (Roschztardt et al., 2009) and SXRF microtomography (Kim et al., 2006; Chu et al., 2010; Donner et al., 2012). The respective advantages and limitations of these different approaches have been recently discussed in several reviews (Deves et al., 2005; Lobinski et al., 2006; Ortega et al., 2009; Punshon et al., 2009, 2012; Donner et al., 2012; Sarret et al., 2013).

Combined together, the information about Fe localization obtained by EDX, histochemical staining and SXRF techniques indicate that in Arabidopsis dry seed, Fe is concentrated in the endodermal cells of the embryo and, at subcellular level,

Table 2 | μ PIXE quantification of various elements in three different *Arabidopsis thaliana* seed genotypes with emphasis on Fe- and Mn-enriched areas.

El.	Seed section		Fe-enriched area		Mn-enriched area	
	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DW}}$	LOD	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DW}}$	LOD	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DW}}$	LOD
WT						
K	17648	36	21393	71	15851	121
Ca	9165	85	7509	140	9060	155
Mn	44	4	22	12	386	13
Fe	159	3	751	5	90	20
Cu	10	2	9	7	n.d.	n.d.
Zn	141	2	311	11	156	15
nr3nr4						
K	19989	30	19443	81	15582	57
Ca	11223	82	10672	128	10315	90
Mn	58	4	85	13	106	7
Fe	189	3	520	11	218	6
Cu	20	2	24	7	9	5
Zn	197	2	281	11	200	5
vit1-1						
K	27274	25	22519	52		
Ca	9757	63	8826	77		
Mn	65	3	172	8		
Fe	157	3	360	8		
Cu	68	2	60	3		
Zn	169	1	224	6		

Concentrations of one representative measured sample of dry seed are presented; LOD, limit of detection of the measurements ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DW}}$); n.d., not detected.



is associated with vacuolar globoids (Lanquar et al., 2005; Kim et al., 2006; Roschztardt et al., 2009). Fe concentrations close to $1000 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DW}}$ in provascular tissues were quantified by μ PIXE (Table 2 and Figure 5). As globoids represent no more than 10% of the cell volume but constitute the main site for Fe storage in

seed cells (Lanquar et al., 2005), endodermal vacuole globoids possibly contain close to 1% Fe. Besides, it has been hypothesized that Fe in the vacuole is mainly stored as Fe^{3+} but this still remains to be demonstrated using XAS (Pich et al., 2001; Otegui et al., 2002). Based on analyses of mutant phenotypes and metal

Table 3 | Fractions of Fe and Mn in *Arabidopsis thaliana* dry and imbibed seed.

El.	Dry		Imbibed	
	% metal	% area	% metal	% area
Fe	50.7 ± 11.2	13.4 ± 5.4	68.9 ± 5.8	17.1 ± 1.5
Mn	30.3 ± 7.0	8.3 ± 6.0	54.4 ± 2.8*	22.4 ± 7.3

The fractions of Fe and Mn quantified in their corresponding enriched areas relative to the whole seed section element content were calculated for dry and imbibed seed. Proportion of each enriched area was also calculated. Values are means ± SE ($n = 3\text{--}4$ scanned sections). Asterisk denotes statistically significant differences based on Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

localization, a mechanism of Fe loading into seed endodermal vacuoles mediated by VIT1 and its release into vasculature cells by NRAMP3 and NRAMP4 during germination has been suggested (Morrissey and Gueriot, 2009; Roschztardtz et al., 2009). Accordingly, recent data indicated that no more than 5% of total seed Fe is associated with the plastidial ferritin in Arabidopsis seed (Ravet et al., 2009a). Concentration of Fe in endodermal vacuoles in the vicinity of the provascular strand cells allows rapid and easy mobilization of Fe to the growing parts of the seedling during germination. Nevertheless, our determination of Fe fractions in dry seed sections by μPIXE revealed that only about 50% of this metal is actually stored around the seed embryo provascular tissue (Table 3). This result indicates that Arabidopsis seeds likely contain two pools of Fe: a pool of concentrated Fe associated to endodermal vacuoles, previously identified by several imaging techniques (Kim et al., 2006; Roschztardtz et al., 2009), and a less concentrated pool spread in all seed tissues, which have so far been overseen. This finding does not contradict the previous assessments about the central role of vacuoles in Fe storage in Arabidopsis (Roschztardtz et al., 2009). However, it points to the existence of significant Fe stores outside of the endodermal cells that have to be taken into account in seed Fe storage models. Moreover, our results suggest that, besides VIT1, which is expressed near the vasculature, other vacuolar Fe uptake systems drive Fe accumulation into the vacuoles of other embryo cells.

Imaging techniques also showed heterogeneous distribution of Mn and Zn in plant seeds (Kim et al., 2006; Vogel-Mikus et al., 2007; Takahashi et al., 2009; Cvitanich et al., 2011). Our analyses by μPIXE showed that up to 30% of the Mn present in Arabidopsis dry seed is stored in subepidermal cells. Until now, the transporters which mediate Mn accumulation in those particular cells remain unknown. In the case of Zn, our quantification of Zn in seed sections by μPIXE indicated that Zn is slightly more concentrated in the embryo provascular tissue. This is in agreement with SXRF microtomography of Arabidopsis seeds (Kim et al., 2006) and μPIXE analysis of Phaseolus seeds (Cvitanich et al., 2011).

METAL REDISTRIBUTION IN ARABIDOPSIS SEED DURING GERMINATION MONITORED BY μPIXE

During germination, seed undergoes drastic morphological and biological changes, necessarily inducing a redistribution of

macro- and micronutrients (Bewley, 1997; Bolte et al., 2011). Whereas mature dry seed is an excellent plant sample stage for imaging by SXRF or μPIXE due to its natural dehydration state, monitoring of seed germination by X-ray imaging techniques remains challenging. Here, a μPIXE analysis of Arabidopsis WT and *nramp3nramp4* mutant after seed imbibition was undertaken. Whereas EDX microanalyses revealed *nramp3nramp4* mutant defect in Fe remobilization from globoids in 2-day old seedling, μPIXE failed to detect any qualitative or quantitative modification of the Fe pattern between the two genotypes at the same stage (Lanquar et al., 2005). As a matter of fact, elemental maps obtained on dry seeds or after imbibitions did not show any obvious difference. Two hypotheses may account for this apparent discrepancy: (1) even though the experiment was performed after 2 days in both case, seedling development may have been slower in the case of the μPIXE experiment, due to differences in the conditions or seed age. Attempts to analyse sections of WT and mutant seeds at later stage were hampered by difficulties to obtain intact sections; (2) after 2 days, Fe may have been remobilized from the globoids, preventing its detection by EDX, but may have remained in the same tissues explaining why no change could be detected at the μm resolution of the μPIXE analysis.

Nevertheless, quantification of Fe, Mn, and Zn in seed sections by μPIXE indicates significant distribution modifications after 48 h of imbibition. During imbibition, Fe and Zn concentrations increase in subepidermal cells of cotyledons, corresponding to the Mn-enriched area, while the fraction of Mn accumulating in those cells significantly increases from 30 to more than 50% of total Mn content. Although the origin of the metals could not be identified as no significant decrease of Fe, Mn, or Zn occurs in other areas, it is likely that during seed imbibition metals are already beginning to be redistributed toward the future photosynthetic cell layers. As the Fe concentration in the endodermal area is unchanged after imbibition, it is tempting to speculate that the Fe that accumulates in the sub epidermal area originates from the “diluted pool” spread in all seed tissues, which would therefore represent a more loosely bound Fe pool. The endodermal pool would be released at later stages of germination.

In conclusion, our study using μPIXE complemented other approaches to analyse metal distribution in Arabidopsis seeds. This fully quantitative approach revealed unsuspected important Fe stores outside the endodermal cells. Analysis after seed imbibition provided a first glimpse at the rapid metal redistribution that occurs during germination.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very thankful to Marie Carrière and Béatrice Satiat-Jeunemaitre for their help to design and initiate the project and to Spencer Brown for critical reading of the manuscript. They thank Alain Brunelle and Alexandre Seyer for kindly providing access and training on the cryostat. Magali Schnell Ramos and Sébastien Thomine were supported by funding from the CNRS, Italian M.U.R.S.T. (FIRB: “Futuro in Ricerca”) and ANR grants ANR-07-BLAN-0110 and ANR-2011-BSV6-00401. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the Conseil Général de l'Essonne.

REFERENCES

- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055–1066. doi: 10.1105/tpc.9.7.1055
- Bolte, S., Lanquar, V., Soler, M. N., Beebo, A., Satiat-Jeunemaitre, B., Bouhidel, K., et al. (2011). Distinct lytic vacuolar compartments are embedded inside the protein storage vacuole of dry and germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol.* 52, 1142–1152. doi: 10.1093/pcp/pcr065
- Briat, J. F., and Lobreaux, S. (1997). Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2, 187–193. doi: 10.1016/S1360-1385(97)85225-9
- Budka, D., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Tylko, G., and Przybyłowicz, W. J. (2005). Freeze-substitution methods for Ni localization and quantitative analysis in *Berkheya cod-dii* leaves by means of PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 231, 338–344. doi: 10.1016/j.nimb.2005.01.080
- Campbell, J. L., Hopman, T. L., Maxwell, J. A., and Nejedly, Z. (2000). Guelph PIXE software package III: alternative proton database. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 170, 193–204. doi: 10.1016/S0168-583X(00)00156-7
- Cestone, B., Vogel-Mikus, K., Quartacci, M. F., Rascio, N., Pongrac, P., Pelicon, P., et al. (2012). Use of micro-PIXE to determine spatial distributions of copper in *Brassica carinata* plants exposed to CuSO₄ or CuEDDS. *Sci. Total Environ.* 427–428, 339–346. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.065
- Chu, H. H., Chiecko, J., Punshon, T., Lanzirrotti, A., Lahner, B., Salt, D. E., et al. (2010). Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* YELLOW STRIPE-LIKE1 and YELLOW STRIPE-LIKE3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiol.* 154, 197–210. doi: 10.1104/pp.110.159103
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719. doi: 10.1016/j.biochi.2006.07.003
- Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., and Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* 18, 92–99. doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.003
- Cvitanich, C., Przybyłowicz, W. J., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Blair, M. W., Astudillo, C., Orlowska, E., et al. (2011). Micro-PIXE investigation of bean seeds to assist micronutrient biofortification. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 269, 2297–2302. doi: 10.1016/j.nimb.2011.02.047
- Cvitanich, C., Przybyłowicz, W. J., Urbanski, D. F., Jurkiewicz, A. M., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Blair, M. W., et al. (2010). Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in *Phaseolus* seeds. *BMC Plant Biol.* 10:26. doi: 10.1186/1471-2229-10-26
- Daudin, L., Khodja, H., and Gallien, J. P. (2003). Development of “position-charge-time” tagged spectrometry for ion beam microanalysis. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 210, 153–158. doi: 10.1016/S0168-583X(03)01008-5
- Deves, G., Isaure, M. P., Le Lay, P., Bourguignon, J., and Ortega, R. (2005). Fully quantitative imaging of chemical elements in *Arabidopsis thaliana* tissues using STIM, PIXE and RBS. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 231, 117–122. doi: 10.1016/j.nimb.2005.01.044
- Donner, E., Punshon, T., Guerinot, M. L., and Lombi, E. (2012). Functional characterisation of metal(loid) processes in planta through the integration of synchrotron techniques and plant molecular biology. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3287–3298. doi: 10.1007/s00216-011-5624-9
- Harrison, P. M., and Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1275, 161–203. doi: 10.1016/j.jsb.2008.12.001
- Isaure, M. P., Frayssé, A., Deves, G., Le Lay, P., Fayard, B., Susini, J., et al. (2006). Micro-chemical imaging of cesium distribution in *Arabidopsis thaliana* plant and its interaction with potassium and essential trace elements. *Biochimie* 88, 1583–1590. doi: 10.1016/j.biochi.2006.08.006
- Khodja, H., Berthoumieux, E., Daudin, L., and Gallien, J. P. (2001). The Pierre Sûre Laboratory nuclear microprobe as a multi-disciplinary analysis tool. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 181, 83–86. doi: 10.1016/S0168-583X(01)00564-X
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirrotti, A., Li, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., et al. (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* 314, 1295–1298. doi: 10.1126/science.1132563
- Kraemer, U., and Clemens, S. (2006). Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Top. Curr. Genet.* 14, 216–271. doi: 10.1007/4735_96
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., et al. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24, 4041–4051. doi: 10.1038/sj.emboj.7600864
- Laurette, J., Larue, C., Mariet, C., Brisset, F., Khodja, H., Bourguignon, J., et al. (2012). Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: oilseed rape, sunflower and wheat. *Environ. Exp. Bot.* 77, 96–107. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.11.007
- Lobinski, R., Moulin, C., and Ortega, R. (2006). Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* 88, 1591–1604. doi: 10.1016/j.biochi.2006.10.003
- Malan, H. L., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W. J., Farrant, J. M., and Linder, P. W. (2012). Distribution patterns of the metal pollutants Cd and Ni in soybean seeds. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 273, 157–160. doi: 10.1016/j.nimb.2011.07.064
- Marschner, H. (2012). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. San Diego, CA: Academic Press.
- Mayer, M. (1999). SIMNRA, a simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA. *AIP Conf. Proc.* 475, 541–544. doi: 10.1063/1.59188
- Mesjasz-Przybyłowicz, J., and Przybyłowicz, W. J. (2002). Micro-PIXE in plant sciences: present status and perspectives. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 189, 470–481. doi: 10.1016/S0168-583X(01)0127-2
- Mikus, M., Bobak, M., and Lux, A. (1992). Structure of protein bodies and elemental composition of phytin from dry germ of maize (*Zea-Mays* L.). *Botanica Acta* 105, 26–33.
- Morrissey, J., and Guerinot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev.* 109, 4553–4567. doi: 10.1021/cr900112r
- Murgia, I., Arosio, P., Tarantino, D., and Soave, C. (2012). Biofortification for combating ‘hidden hunger’ for iron. *Trends Plant Sci.* 17, 47–55. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.003
- Ortega, R., Deves, G., and Carmona, A. (2009). Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J. R. Soc. Interface* 6, S649–S658. doi: 10.1098/rsif.2009.0166.focus
- Otegui, M. S., Capp, R., and Staehelin, L. A. (2002). Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 14, 1311–1327. doi: 10.1105/tpc.010486
- Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G., and Schmidt, W. (2001). Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213, 967–976. doi: 10.1007/s004250100573
- Punshon, T., Guerinot, M. L., and Lanzirrotti, A. (2009). Using synchrotron X-ray fluorescence microprobes in the study of metal homeostasis in plants. *Ann. Bot.* 103, 665–672. doi: 10.1093/aob/mcn264
- Punshon, T., Hirschi, K., Yang, J., Lanzirrotti, A., Lai, B., and Guerinot, M. L. (2012). The role of CAX1 and CAX3 in elemental distribution and abundance in *Arabidopsis* seed. *Plant Physiol.* 158, 352–362. doi: 10.1104/pp.111.184812
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J. F., Gaymard, F., and Cellier, F. (2009a). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57, 400–412. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03698.x
- Ravet, K., Touraine, B., Kim, S. A., Cellier, F., Thomine, S., Guerinot, M. L., et al. (2009b). Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular iron trafficking during fruit development in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2, 1095–1106. doi: 10.1093/mp/ssp041
- Roschztardt, H., Conejero, G., Curie, C., and Mari, S. (2009). Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol.* 151, 1329–1338. doi: 10.1104/pp.109.144444
- Sarret, G., Smits, E. A. H., Michel, H. C., Isaure, M. P., Zhao, F. J., and Tapper, R. (2013). *Advances in Agronomy*. San Diego, CA: Academic Press.
- Sarret, G., Willems, G., Isaure, M. P., Marcus, M. A., Fakra, S. C., Frerot, H., et al. (2009). Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis hal-leri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. *New Phytol.* 184, 581–595. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02996.x

- Schneider, T., Strasser, O., Gierth, M., Scheloske, S., and Povh, B. (2002). Micro-PIXE investigations of apoplastic iron in freeze-dried root cross-sections of soil grown barley. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 189, 487–493. doi: 10.1016/S0168-583X(01)01129-6
- Takahashi, M., Nozoye, T., Kitajima, N., Fukuda, N., Hokura, A., Terada, Y., et al. (2009). *In vivo* analysis of metal distribution and expression of metal transporters in rice seed during germination process by microarray and X-ray Fluorescence Imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu. *Plant Soil* 325, 39–51. doi: 10.1007/s11104-009-0045-7
- Tylko, G., Mesjasz-Przybylowicz, J., and Przybylowicz, W. J. (2007). In-vacuum micro-PIXE analysis of biological specimens in frozen-hydrated state. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 260, 141–148. doi: 10.1016/j.nimb.2007.02.017
- Vaughan, J. G., and Whitehouse, J. M. (1971). Seed structure and the taxonomy of the Cruciferae. *Bot. J. Linn. Soc.* 64, 383–409. doi: 10.1111/j.1095-8339.1971.tb02153.x
- Vogel-Mikus, K., Pelicon, P., Vavpetic, P., Kreft, I., and Regvar, M. (2009). Elemental analysis of edible grains by micro-PIXE: common buckwheat case study. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 267, 2884–2889. doi: 10.1016/j.nimb.2009.06.104
- Vogel-Mikus, K., Pongrac, P., Kump, P., Necemer, M., Simcic, J., Pelicon, P., et al. (2007). Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environ. Pollut.* 147, 50–59. doi: 10.1016/j.envpol.2006.08.026
- Vogel-Mikus, K., Regvar, M., Mesjasz-Przybylowicz, J., Przybylowicz, W. J., Simcic, J., Pelicon, P., et al. (2008). Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytol.* 179, 712–721. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02519.x
- Young, L. W., Westcott, N. D., Attenkofer, K., and Reaney, M. J. T. (2006). A high-throughput determination of metal concentrations in whole intact *Arabidopsis thaliana* seeds using synchrotron-based X-ray fluorescence spectroscopy. *J. Synchrotron. Radiat.* 13, 304–313. doi: 10.1107/S0909049506019571
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 05 March 2013; paper pending published: 21 March 2013; accepted: 13 May 2013; published online: 03 June 2013.
- Citation: Schnell Ramos M, Khodja H, Mary V and Thomine S (2013) Using μPIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Front. Plant Sci.* 4:168. doi: 10.3389/fpls.2013.00168
- This article was submitted to *Frontiers in Plant Nutrition*, a specialty of *Frontiers in Plant Science*.
- Copyright © 2013 Schnell Ramos, Khodja, Mary and Thomine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

APPENDIX

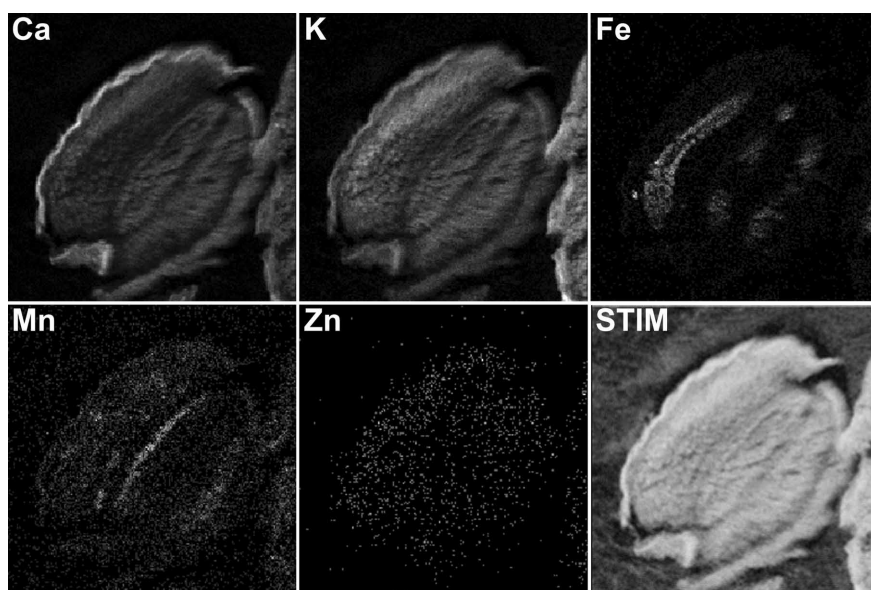


FIGURE A1 | μ PIXE elemental reconstituted image of *Arabidopsis thaliana* dry seed section. Total X-ray spectra of areas scanned with 3 MeV proton beam were collected. Specific distributions of Ca, K, Fe, Mn,

and Zn in a 30 μ m thick longitudinal section of *Arabidopsis* dry seed are separately. The associated STIM image shows the local mass of the sample. Scale bar: 100 μ m.

Summary

Over 30% of the world population is iron deficient (WHO resources). One strategy proposed to fight iron deficiency is to improve iron (Fe) content and availability in crops, especially in seeds. To address this challenge, it is crucial to decipher the mechanisms that control Fe storage during seed development.

In *Arabidopsis thaliana* seeds, iron is stored in the vacuoles of cells surrounding the vasculature of the embryo. The AtVIT1 transporter is involved in Fe influx into vacuoles. The *vit1-1* mutant displays an altered Fe pattern: Fe is accumulated in abaxial cells of the cotyledons and radicle peripheral cells. AtNRAMP3 and AtNRAMP4 function redundantly in Fe retrieval from vacuoles during germination. When germinated under iron deficient conditions, *nramp3nramp4* double mutant development is altered as a consequence of impaired Fe mobilization.

To identify novel genes involved in seed Fe homeostasis, we screened an EMS mutagenized population of *nramp3nramp4* for mutations restoring the growth of *nramp3nramp4* on low Fe. We named these mutants *isv* for “bypass iron storage in vacuoles”. The 29 confirmed *isv* mutants identified by the screen have been classified according to the iron localization pattern in their embryo after Perls/DAB staining: 20 display a wild type pattern, 3 display a pattern of Fe localization similar to *vit1-1* mutant and 6 do not show any staining in most embryos. The three *isv* mutants displaying a *vit1-1* like pattern were further investigated. In two of them, mutations in the *AtVIT1* gene were shown to be responsible for the suppressor phenotype. This result establishes a genetic and functional link between Fe loading in endodermal vacuoles by AtVIT1 and its retrieval by AtNRAMP3 and AtNRAMP4. The third *isv* mutant with a *vit1-1* like iron localization pattern does not carry any mutation in *AtVIT1* coding sequence. Identification of the mutated gene will likely uncover molecular mechanisms regulating VIT1 action. For seven other confirmed *isv* mutants, F2 populations are available. High-throughput sequencing of batched segregants from these F2 populations will allow to map and identify the mutations causing the suppression.

Résumé

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 30% de la population mondiale souffre de carence en fer. Une des stratégies proposées afin d'endiguer l'anémie due à cette carence est d'augmenter le contenu en fer et sa disponibilité dans les parties consommées des plantes, en particulier les graines. Pour répondre à ce défi, il est important de comprendre les mécanismes de stockage du fer dans la graine.

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le fer est stocké au sein des vacuoles des cellules entourant les tissus vasculaires de l'embryon. Le transporteur AtVIT1 est impliqué dans l'entrée de fer au sein de ces vacuoles. Le mutant *vit1-1* présente un patron de distribution du fer modifié : le fer est accumulé dans les cellules sous épidermiques abaxiales des cotylédons et les cellules corticales de la radicule. AtNRAMP3 et AtNRAMP4 fonctionnent de manière redondante permettant la sortie du fer vacuolaire lors de la germination. En conditions de carence en fer, le double mutant *nramp3nramp4* présente un arrêt développemental associé à une forte chlorose dus à son incapacité à utiliser ses stocks de fer vacuolaire.

Pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'homéostasie du fer au sein de la graine, nous avons criblé une population de double mutant *nramp3nramp4* mutagénisé à l'EMS à la recherche de supprimeurs du phénotype du double mutant sur un milieu carencé en fer. Nous avons nommés ces mutants *isv* pour "bypass iron storage in vacuoles". Nous avons confirmé et classifié 29 candidats selon le patron de distribution du fer de leurs embryons : 20 présentent un patron similaire au type sauvage, 3 dont le patron est semblable à celui du mutant *vit1-1* et enfin 6 ne présentent pas de colorations dans la plupart de leurs embryons. Les 3 mutants *isv* présentant un patron similaire à *vit1-1* ont été caractérisés de manière plus approfondie. Chez deux d'entre eux, nous avons démontré que des mutations dans le gène *AtVIT1* sont responsables du phénotype suppresseur. Ce résultat établit un lien génétique et fonctionnel entre le stockage du fer dans les vacuoles endodermiques par AtVIT1 et sa libération par AtNRAMP3 et AtNRAMP4. Le troisième mutant *isv* au patron semblable à *vit1-1* ne porte pas de mutations dans la séquence codante d'*AtVIT1*. L'identification du gène affecté apportera sans doute des informations sur la régulation de *VIT1*. Enfin, pour sept autres mutants *isv*, nous disposons actuellement des populations F2 dont l'analyse par séquençage haut débit permettra de déterminer la mutation responsable du phénotype suppresseur.

Résumé

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 30% de la population mondiale souffre de carence en fer. Une des stratégies proposées afin d'endiguer l'anémie due à cette carence est d'augmenter le contenu en fer et sa disponibilité dans les parties consommées des plantes, en particulier les graines. Pour répondre à ce défi, il est important de comprendre les mécanismes de stockage du fer dans la graine.

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le fer est stocké au sein des vacuoles des cellules entourant les tissus vasculaires de l'embryon. Le transporteur AtVIT1 est impliqué dans l'entrée de fer au sein de ces vacuoles. Le mutant *vit1-1* présente un patron de distribution du fer modifié : le fer est accumulé dans les cellules sous épidermiques abaxiales des cotylédons et les cellules corticales de la radicule. AtNRAMP3 et AtNRAMP4 fonctionnent de manière redondante permettant la sortie du fer vacuolaire lors de la germination. En conditions de carence en fer, le double mutant *nramp3nramp4* présente un arrêt développemental associé à une forte chlorose dus à son incapacité à utiliser ses stocks de fer vacuolaire.

Pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'homéostasie du fer au sein de la graine, nous avons criblé une population de double mutant *nramp3nramp4* mutagénisé à l'EMS à la recherche de supprimeurs du phénotype du double mutant sur un milieu carencé en fer. Nous avons nommés ces mutants *isv* pour "bypass iron storage in vacuoles". Nous avons confirmé et classifié 29 candidats selon le patron de distribution du fer de leurs embryons : 20 présentent un patron similaire au type sauvage, 3 dont le patron est semblable à celui du mutant *vit1-1* et enfin 6 ne présentent pas de colorations dans la plupart de leurs embryons. Les 3 mutants *isv* présentant un patron similaire à *vit1-1* ont été caractérisés de manière plus approfondie. Chez deux d'entre eux, nous avons démontré que des mutations dans le gène *AtVIT1* sont responsables du phénotype supprimeur. Ce résultat établit un lien génétique et fonctionnel entre le stockage du fer dans les vacuoles endodermiques par AtVIT1 et sa libération par AtNRAMP3 et AtNRAMP4. Le troisième mutant *isv* au patron semblable à *vit1-1* ne porte pas de mutations dans la séquence codante d'*AtVIT1*. L'identification du gène affecté apportera sans doute des informations sur la régulation de *VIT1*. Enfin, pour sept autres mutants *isv*, nous disposons actuellement des populations F2 dont l'analyse par séquençage haut débit permettra de déterminer la mutation responsable du phénotype supprimeur.